



763-1 2024-04-22



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК 14 типов вирусов папилломы человека
высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
и дифференцированного определения ДНК 16, 18, 45 типов
методом ПЦР в режиме реального времени

ВПЧ-Скрин

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2022/17545 от 21 июня 2022 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	5
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	8
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	13
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	15
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	18
9	УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	18
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	20
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	21
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	21
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	21
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	21
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	22
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ВПЧ	- вирус папилломы человека
ВКР	- высокий канцерогенный риск
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ИВ	- интерферирующие вещества
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

1 ПРЕНАДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1** Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК 14 типов вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) и дифференцированного определения ДНК 16, 18, 45 типов методом ПЦР в режиме реального времени (ВПЧ-Скрин).
- 1.2** Назначение: набор реагентов предназначен для качественного выявления ДНК четырнадцати типов вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов), ассоциированных с раком шейки матки, и дифференцированного определения ДНК ВПЧ 16, 18 и 45 типов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в биологическом материале человека (мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища).
- 1.3** Функциональное назначение: скрининг, диагностика *in vitro*.
- 1.4** Показания к проведению исследования: скрининг предрака и рака шейки матки, симптомы ВПЧ-инфекции.
Противопоказаний к применению нет.
- 1.5** Популяционные и демографические аспекты: целевая группа пациентов для скрининга – женщины 25-65 лет, диагностика осуществляется без возрастных ограничений.
- 1.6** Область применения: набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.
- 1.7** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
- 1.8** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P325-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-P325-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 96 определений, что соответствует исследованию не более 94 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов: в режиме реального времени; мультиплексный качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Для фасовки S «горячий» старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит

только после плавления парафина. Помимо этого, парафин обеспечивает запечатывание реакционной смеси и дополнительную защиту от контаминации ампликонами.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав смеси для амплификации, включена система для амплификации фрагмента геномной ДНК человека (контроль взятия материала, КВМ), которая позволяет оценить наличие ДНК в амплификационной пробирке и контролировать все этапы анализа.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации специфической ДНК, включены флуоресцентные метки Fam, Rox, Cy5, Cy5.5. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации контроля взятия материала, входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
16	КВМ	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	18	45

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов ВПЧ-Скрин.

2.4 Время проведения анализа (не включая пробоподготовку): от 1,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вирусов папилломы человека 16 типа, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты амплификации специфического продукта по каналу Fam и Rox.

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вирусов папилломы человека 18 типа, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты амплификации специфического продукта по каналу Cy5 и Rox.

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК вирусов папилломы человека 45 типа, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты амплификации специфического продукта по каналу Cy5.5 и Rox.

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК одного или нескольких типов вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты амплификации специфического продукта по каналу Rox.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК 14 типов вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательные результаты амплификации специфического продукта по каналам детекции Fam, Rox, Cy5 и Cy5.5 и положительный результат амплификации KBM по каналу детекции Hex.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК следующих бактерий и вирусов: *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Lactobacillus spp.*, EBV, HHV6, HHV8, HSV1, HSV2, VZV.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. 2.3, 9.3).

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже:

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Исследованная концентрация в образце
Эндогенные вещества		
мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	Гемоглобин*	0,35 мг/мл
мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	Слизь (муцин)	20 %
Экзогенные вещества		
мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	Изопропиловый спирт*	10%
мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	Метилацетат*	10%
мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	Хлоргексидина биглюконат	10%
мазок/соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища	Мирамистин®	10%
* - интерферирующее вещество может присутствовать в препарате ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК		

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения по 5 копий ДНК каждого типа вируса папилломы человека на амплификационную пробирку, что соответствует по 10³ копий ДНК каждого типа вируса папилломы человека на 1,0 мл.

3.4 Диагностические характеристики

Количество исследований (n) – 436

Выявляемый анализ	Диагностическая чувствительность (ДИ95%)	Диагностическая специфичность (ДИ95%)
ВПЧ 16 типа	100.00% (96,38%-100,00%)	100.00% (98,91%-100,00%)
ВПЧ 18 типа	100.00% (83,16%-100,00%)	100.00% (99,12%-100,00%)
ВПЧ 45 типа	100.00% (69,15%-100,00%)	100.00% (99,14%-100,00%)
ВПЧ 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 (без дифференциации) (без учёта 16, 18 и 45 типа)	100.00% (98,54%-100,00%)	100.00% (98,04%-100,00%)

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	-
Раствор Таq-полимеразы	Нет опасных веществ	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов ВПЧ-Скрин требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- ПЦР-бокс (например, ООО «НПО ДНК-Технология, РУ № РЗН 2015/3193);
- амплификаторы детектирующие «ДТпрайм» (РУ № ФСР 2011/10229) или «ДТлайт» (РУ № ФСР 2011/10228) с 5-ю каналами детекции¹ (ООО «НПО ДНК-Технология»).
- микроцентрифуга-вортекс (например, Микро-Спин FV-2400, Biosan, Латвия);
- ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- холодильник или холодильная камера (например, Атлант, Беларусь);
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл и для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные, позволяющие отбирать объем жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл (например, Eppendorf Research Plus, Германия);
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 10 мкл (например, SSI, США, РУ № ФСЗ 2011/10287);
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл (например, SSI, США, РУ № ФСЗ 2011/10287);
- одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл (например, SSI, США, РУ № ФСЗ 2011/10287);
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные (например, РУ № РЗН 2021/15545);
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

¹ - ДТпрайм только модели 5M1; 5M3; 5M6
ДТлайт только модели 5S1; 5S2

При использовании детектирующих амплификаторов с четырьмя каналами детекции 45 тип папилломы не типифицируется

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки/соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища.

6.2 Общие требования

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.3 Взятие материала на исследование

Мазки/соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища)

Взятие материала осуществляется с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – зондов, цитощётки или тампонов, в зависимости от источника биологического материала, согласно установленной процедуре.

ВНИМАНИЕ! Использование цитощётки противопоказано при беременности.

Допускается использование зондов для самозабора материала.

Ограничение метода – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования.

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

Примечание – Перед получением соскоба эпителиальных клеток с заднего свода влагалища и цервикального канала, свободно стекающее отделяемое необходимо удалить стерильным ватным тампоном.

Взятие материала в транспортно-фиксирующую среду для жидкостной цитологии осуществляется в соответствии с Инструкцией к транспортно-фиксирующей среде для жидкостной цитологии.

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

Условия транспортирования и хранения мазки/соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища определяются инструкциями к используемым для транспортирования и хранения образцов транспортным средам или инструкциями к рекомендуемым наборам/комплектам реагентов для выделения ДНК.

6.5 Подготовка биоматериала для исследования

6.5.1 Подготовка мазки/соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, влагалища, взятых в транспортные среды для ПЦР-исследований.

6.5.1.1 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 16000 в течение 10 мин.

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса ротора. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.5.1.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объём (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора/комплекта реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

6.5.2 Подготовка материала из влагалища, взятого с использованием устройства для самостоятельного забора проб:

6.5.2.1 Добавить в пробирку (или другую емкость, указанную в инструкции к устройству для самостоятельного забора проб (далее «пробирка»)), в которой находится наконечник устройства, 500 мкл физиологического раствора;

6.5.2.2 Встряхнуть пробирку в течение 15 с.

6.5.2.3 Извлечь наконечник устройства из пробирки и выбросить;

6.5.2.4 Перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл;

6.5.2.5 Центрифугировать пробирку при RCF(g) 16000 в течение 10 мин;

6.5.2.6 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

6.5.3 Соскобы, взятые в транспортно-фиксирующую среду для жидкостной цитологии
При фиксации в некоторых спиртовых транспортных средах для жидкостной цитологии, например, в консервирующей жидкости BD SurePath (Becton Dickinson, США, (РУ № ФСЗ 2010/06235) происходит сшивание нуклеиновых кислот с белками, поэтому необходима предварительная обработка образцов с целью освобождения ДНК из белок-ассоциированных комплексов и лизиса клеток.

Соскобы, взятые в транспортно-фиксирующую среду для жидкостной цитологии BD SurePath (Becton Dickinson, США, РУ № ФСЗ 2010/06235), необходимо предобработать с использованием набора реагентов «ПРОБА-ПК» (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14384) в соответствии с инструкцией к набору реагентов «ПРОБА-ПК».

Транспортно-фиксирующие среды PreservCyt ThinPrep (Hologic Inc, США, РУ № ФСЗ 2012/11750) или Cellprep AUTO (Biodyne Co. Ltd., Корея, РУ № РЗН 2020/11462) не требуют предварительной обработки образцов с использованием набора реагентов «ПРОБА-ПК».

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка образцов биологического материала.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать следующие наборы/комплекты реагентов: Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) в комплектации ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; Комплект реагентов для выделения ДНК в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, Форма комплектации ПРОБА-ГС, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) Комплектация ПРОБА-МЧ-РАПИД, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия РУ № РЗН 2017/5753; Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2008/02939.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору/комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции к соответствующему набору/комплекту реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-».

Пример: необходимо проанализировать 4 образца. Для этого необходимо промаркировать 4 пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте пробирки.

7.2.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

- 7.2.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).
- 7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.2.9 Центрифугируйте все пробирки/стрипы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.10 Установите все пробирки/стрипы в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора в режиме «Работа с прибором» и проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программе амплификации, приведенной в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5	√	Цикл
	64	0	15			
3	94	0	10	45	√	Цикл
	64	0	15			
4	94	0	5	1		Цикл
5	10 ¹	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Примечания:

1. Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объем реакционной смеси и т.п.) можно сохранить в виде готового файла «HPV-screen».
2. При последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест («HPV-screen»), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.
- 8.2 Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.
- 8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке.

9 УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2 После завершения ПЦР программа отображает в таблице в графе «Результат»: «+» или «-». В этом случае выдается заключение по результатам исследования.
- 9.3 Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 3. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 3 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции					Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5	
+	Не учитывается	+	-	-	Обнаружена ДНК HPV 16
-	Не учитывается	+	+	-	Обнаружена ДНК HPV 18
-	Не учитывается	+	-	+	Обнаружена ДНК HPV 45
-	Не учитывается	+	-	-	Обнаружена ДНК HPV 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 (без дифференциации)
-	+	-	-	-	Не обнаружена ДНК HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
-	-	-	-	-	Недостовверный результат
Положительный контрольный образец					
+	+	+	+	+	Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец					
-	-	-	-	-	Результаты постановки валидны

- 9.4** Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).
- 9.5** Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 3.
- 9.6** При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.
- 9.7** При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

10.2.2 Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, а также с истекшим сроком годности, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.
- 11.2** Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора реагентов		Не стерильно
	Дата изготовления		

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 2.105-2019 ЕСКД Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство (СПП). Медицинские изделия.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты являлись действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: Россия, 117246, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

1. ООО «ДНК-Технология ТС»,
Россия, 117246, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
2. ООО «НПО ДНК-Технология»,
Россия, 142281, Московская обл. г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ВПЧ-Скрин, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

ДНК-Технология

117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)

E-mail: hotline@dna-technology.ru