

Набор реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» по ТУ 21.20.23-038-09286667-2019

«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
1.1. Область применения	4
1.2. Показания к применению	4
1.3. Противопоказания к применению	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	6
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип7	7
2.4. Техническое обслуживание и ремонт.....	7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	8
3.1. Внутренний контроль качества	8
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	10
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ.....	10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	12
6.1. Взятие исследуемого материала.....	12
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии	13
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	14
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	14
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	16
7.1. Мазки со слизистой оболочки влагалища	16
7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	16
7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры.....	19
7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	19
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	20
8.2. Подготовка реагентов для амплификации.....	20
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	21
8.4. Анализ и вычисление результатов	23
8.5. Интерпретация результатов	24
8.6. Возможные ошибки.....	26
8.7. Диагностическое значение полученного результата	27
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	27
9.1. Предел обнаружения.....	27
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	28
9.3. Аналитическая специфичность.....	28
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения	29
9.5. Правильность измерения	31
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	31
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ и ДНК человека	33
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	34
10.1. Срок годности	34
10.2. Транспортирование.....	34
10.3. Хранение.....	34
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	34
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

CIN2+	– дисплазия средней и высокой степени, рак шейки матки
Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип»	– Набор реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» по ТУ 21.20.23-038-09286667-2019
ВКО	– внутренний контрольный образец
ВПЧ ВКР	– вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем
К-	– отрицательный контроль ПЦР
К1	– калибровочный образец 1, положительный контроль ПЦР
К2	– калибровочный образец 2, положительный контроль ПЦР
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначен для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК ВПЧ, ассоциированных с высоким риском дисплазии эпителия шейки матки у женщин. Набор позволяет выявлять 14 типов ВПЧ ВКР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) в биологическом материале (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в инструкции по применению набора в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

1.1. Область применения

Набор используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций урогенитального тракта. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.2. Показания к применению

Набор используется для комплексного анализа, направленного на выявление ИППП в биологическом материале, полученном в ходе скрининговых исследований, с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

1.3. Противопоказания к применению

Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно. Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь ВПЧ-1	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-смесь ВПЧ-2	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-смесь ВПЧ-3	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-смесь ВПЧ-4	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	4 пробирки	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
К1 ВПЧ генотип	0,24	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 ВПЧ генотип	0,24	2 пробирки	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	2 пробирки	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Программное обеспечение «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип ПО» версия 1.0 ¹	-	-	На USB флэш-накопителе.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	-	1
Инструкция по применению набора	На USB-флэш носителе и в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Вкладыш к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/passport/	1
Руководство оператора	На USB-флэш носителе и в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1

¹ Класс безопасности программного обеспечения в соответствии с ГОСТ Р МЭК 62304 – класс А.

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых типов ВПЧ ВКР, внутреннего контрольного образца² (ВКО) и ДНК β -глобинового гена человека при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК ВПЧ ВКР основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами K1 ВПЧ генотип и K2 ВПЧ генотип – образцами с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на 100 000 клеток человека для снижения влияния качества забора материала.

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

²ВКО (ВКО А или ВКО-FL) входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

Каждый исследуемый образец тестируется в 4-х пробирках, в которых на этапе амплификации одновременно амплифицируются участки ДНК-мишеней согласно таблице 3. Результаты амплификации регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ³	ROX	Cy5
ПЦР-смесь	ДНК-мишень			
ПЦР-смесь ВПЧ-1	ДНК ВПЧ тип 16	ДНК ВПЧ тип 18	ДНК ВПЧ тип 45	ДНК β-глобинового гена человека (эндогенный ВКО)
ПЦР-смесь ВПЧ-2	ДНК ВПЧ тип 35	ДНК ВПЧ тип 68	ДНК ВПЧ тип 59	ДНК ВПЧ тип 51
ПЦР-смесь ВПЧ-3	ДНК ВПЧ тип 58	ДНК ВПЧ тип 52	ДНК ВПЧ тип 33	ДНК ВПЧ тип 56
ПЦР-смесь ВПЧ-4	ДНК ВПЧ тип 39	ДНК ВПЧ тип 31	ДНК ВПЧ тип 66	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
ПЦР-смесь	Область амплификации			
ПЦР-смесь ВПЧ-1	E6 gene	E6 gene	E7 gene	β-globin gene
ПЦР-смесь ВПЧ-2	E6 gene	E7 gene	E6 gene	E6 gene
ПЦР-смесь ВПЧ-3	E6 gene	E7 gene	E7 gene	E7 gene
ПЦР-смесь ВПЧ-4	E6 gene	E6 gene	E6 gene	Искусственно синтезированная последовательность

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип

Измерение значений концентрации калибраторов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип производится относительно контрольных калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию контрольных калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

2.4. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

³ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, VIC.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контроль (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ и контроля, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля используются реагенты К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК ВПЧ и ДНК β -глобинового гена человека в исследуемых образцах проводится относительно количественно

охарактеризованных калибровочных образцов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип. Исследование калибровочных образцов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов К1 ВПЧ генотип и К2 ВПЧ генотип и исследуемых образцов. Эффективность калибровки укладывается в заданный диапазон. Если эффективность калибровки не укладывается в заданный диапазон, повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

3.1.3. Контроль ингибирования и качества забора материала

Для оценки качества забора биоматериала используется эндогенный внутренний контроль - ДНК β -глобинового гена человека. Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО⁴, который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции и эндогенного ВКО - ДНК β -глобинового гена человека, который присутствует в каждом исследуемом образце, содержащем клинический материал от человека, и контрольных калибраторах. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК ВКО и/или ДНК β -глобинового гена человека, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции. Допускается отсутствие ДНК ВКО в исследуемых образцах, при обнаружении ДНК ВПЧ высокой концентрации.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим

⁴ВКО (ВКО А или ВКО-FL) входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК ВПЧ.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL или ВКО А, входящим в состав наборов реагентов для экстракции. При использовании проб ДНК, экстрагированных из биоматериала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии, ВКО добавлять после стадии отмывки клеток, при проведении лизиса образцов.

4.5. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие

возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал⁶, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁶ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда с муколитиком для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобный материал или отделяемое

слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), содержащая консервант.

6.1.2. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки), содержащая изотонический водно-солевой раствор с консервантом.

6.1.3. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала для жидкостной цитологии (соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала), содержащая консервант, спирты, натрий-фосфатный буферный раствор, солевые растворы и др.

6.1.4. Зонд универсальный стерильный для взятия биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки)), однократного применения, изготовленный из полипропилена, состоящий из головки (рабочая часть), и ручки. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.1.5. Щетка эндоцервикальная / цитощетка для взятия биологического материала для жидкостной цитологии (соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала) однократного применения, стерильная.

6.1.6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5,0 мл, для взятия биологического материала для жидкостной цитологии.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5 мл.

6.2.2. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 5 мл.

6.2.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.7. Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.8. Центрифуга-вортекс.

6.2.9. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043), «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2012/14204), «МагноПрайм ВПЧ», либо любой другой рекомендованный производителем набор, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки)) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;

- состав набора включает внутренний контрольный образец – реагент «ВКО А» или «ВКО-FL»;

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! При исследовании образцов, взятых в транспортную среду для жидкостной цитологии, необходимо использовать набор реагентов «МагноПрайм ВПЧ».

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской

оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа – Rotor-Gene Q, либо планшетного типа – QuantStudio 5 или C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96, либо аналогичный, рекомендованный производителем, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4.

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;

- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;

- скорость нагрева не менее 2°C/сек;

- скорость охлаждения не менее 1°C/сек.

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки)).

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Рабочую поверхность зонда поместить в транспортную среду, обломав пластиковую основу. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

7.2.1. Взятие материала

Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном.

Взятие материала провести из цервикального канала:

- с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению цитощетки / зонда;

- с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки в пробирку с транспортной средой для жидкостной цитологии, содержащей спирты, натрий-

фосфатный буферный раствор, солевые растворы и др., в соответствии с инструкцией по применению цитощетки.

При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

7.2.2. Предварительная подготовка образцов, взятых в транспортную среду для жидкостной цитологии

Отобрать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовую пробирку. Рекомендуется сначала отобрать аликвоту клеток для ПЦР-исследования, после отобрать аликвоту клеток – для проведения жидкостной цитологии.

7.2.2.1. Подготовка эпителиальных клеток (выбрать один из вариантов)

Вариант 1

а) Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на 12 часов для осаждения клеток.

б) Аккуратно из раствора отобрать **0,5 – 1,0 мл осевших клеток** со дна флакона и перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл, на пробирке указать название образца.

в) Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.

г) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

Вариант 2

а) Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток.

б) Аккуратно из раствора отобрать **2 – 5 мл клеточной суспензии** (в зависимости от ее плотности) и перенести в чистую пробирку объемом 5 мл, на пробирке указать название образца.

в) Пробирки с образцами центрифугировать при **600 g** (3000 об/мин) **не менее 10 минут** или оставить пробирки в штативе при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) на 12 часов для осаждения клеток.

г) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок.

д) В пробирке на 5 мл должно остаться 900 - 1000 мкл осадка. Перенести в чистую пробирку на 1,5 мл весь объем осадка.

е) Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин.**

ж) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке на 1,5 мл должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

7.2.2.2. Отмывка эпителиальных клеток

а) В каждую пробирку с осадком клеток внести по **1 мл М-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ». Тщательно перемешать пробирки на вортексе и поставить осаждаться на **30 мин** в штативе.

ВНИМАНИЕ! Если по истечении 30 минут в пробирке видны следы не растворившейся слизистой пробки, необходимо дополнительно перемешать пробирку на вортексе и оставить в штативе еще на 15 мин.

б) Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин.**

в) Аккуратно удалить надосадочную жидкость по стенке пробирки, не захватывая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Оставить 100 - 200 мкл осадка.

г) В каждую пробирку внести по **1 мл Ф-буфера** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно перемешать на вортексе.

д) Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин.**

е) Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. в). Оставить 100 - 200 мкл осадка. Далее, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости, не захватывая осадок, из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, используя автоматический дозатор.

ж) В каждую пробирку с осадком клеток внести по **100 мкл Ц-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Пробирки перемешать на вортексе.

з) Инкубировать пробы **не менее 2 часов (допускается оставить на ночь)** при температуре **60 °С**.

7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Взятие эпителиального соскоба из уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки прямой кишки

Перед взятием мазка провести тщательный туалет с мылом и водой области вокруг анального отверстия.

Взятие материала провести с поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком, в пробирку с транспортной средой, содержащей изотонический водно-солевой раствор с консервантом, в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинично-диагностической лаборатории⁷:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

⁷ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

Экстракцию ДНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии ВКО.

ВНИМАНИЕ! При использовании транспортной среды для жидкостной цитологии ВКО добавлять при проведении лизиса образцов.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОК) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **100 мкл**.

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы для каждой из 4-х ПЦР-смесей ВПЧ и Буфера В, требующиеся для приготовления реакционных смесей (см. таблицу 5). Каждую смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционных смесей

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ВПЧ-1	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
ПЦР-смесь ВПЧ-2	$10,0 \cdot (N+1)$	
ПЦР-смесь ВПЧ-3	$10,0 \cdot (N+1)$	
ПЦР-смесь ВПЧ-4	$10,0 \cdot (N+1)$	
Буфер В	$5,0 \cdot (N+1)$	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесями и Буфером В, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционные смеси в 4-х отдельных пробирках, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смеси и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленных **реакционных смесей** в соответствии с рисунком 1.

ВНИМАНИЕ! Для корректной обработки результатов ПЦР с использованием программного обеспечения для автоматического анализа и интерпретации результатов необходимо строго следовать приведенной схеме внесения реакционных смесей и проб ДНК и расстановки пробирок в амплификатор (рис. 1).

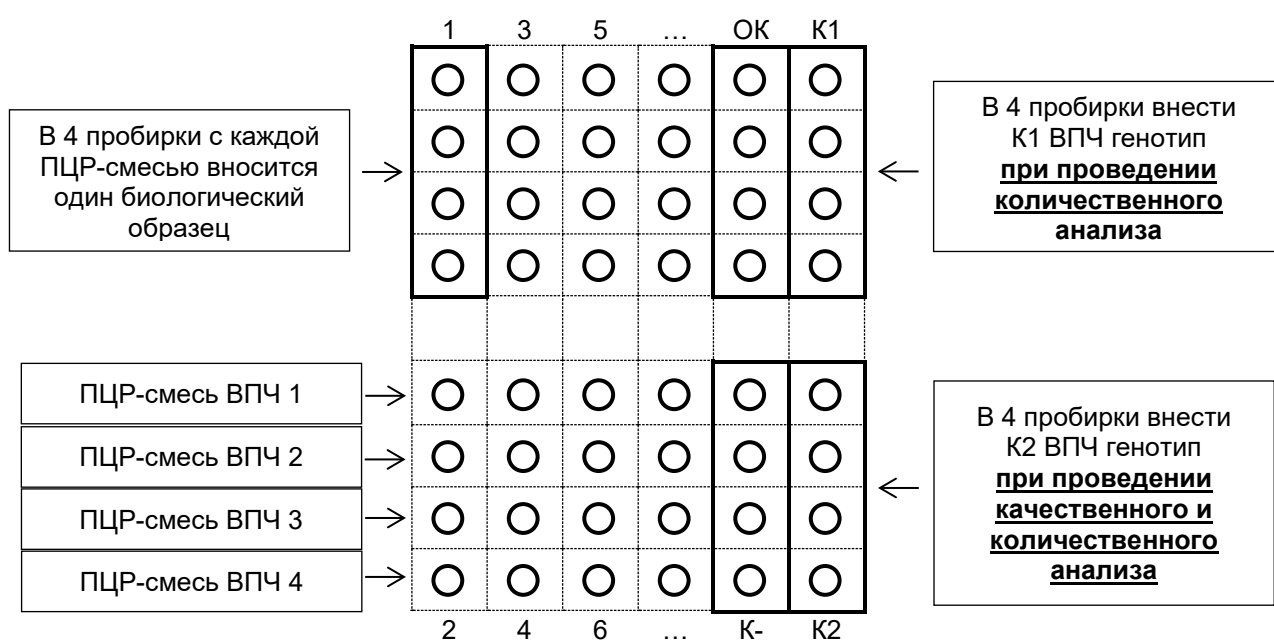


Рисунок 1 – **Схема внесения реакционных смесей и образцов и расстановки пробирок в амплификатор**

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционных смесей хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или

магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционными смесями по **10 мкл проб ДНК**. Выделенная ДНК из образца от одного пациента вносится в 4 пробирки с разными ПЦР смесями.

8.3.2. Внести контрольные образцы.

Для качественного определения ДНК:

а) положительный контроль ПЦР – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ для образцов **К2** внести по **10 мкл К2 ВПЧ генотип**.

б) отрицательный контроль экстракции – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ для образцов **ОК** внести по **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ для образцов **К-** внести по **10 мкл реагента К-**.

Для количественного определения ДНК:

а) Образец **К1** – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ внести по **10 мкл К1 ВПЧ генотип**.

б) Образец **К2** – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ внести по **10 мкл К2 ВПЧ генотип**.

в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ для образцов **ОК** внести по **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

г) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями ВПЧ для образцов **К-** внести по **10 мкл реагента К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G ⁸ , ROX, Cy5	

Примечание - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной

⁸ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE и VIC.

транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип ПО» версии 1.0, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-носителе, входящем в состав набора, а также на официальном сайте Производителя по адресу: <http://www.nextbio.ru/reagents/>. Необходимые значения для расчета результатов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по четырем каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Sy5
ПЦР-смесь	Продукт амплификации			
ПЦР-смесь ВПЧ-1	ДНК ВПЧ тип 16	ДНК ВПЧ тип 18	ДНК ВПЧ тип 45	ДНК β-глобинового гена человека (ВКО Glob)
ПЦР-смесь ВПЧ-2	ДНК ВПЧ тип 35	ДНК ВПЧ тип 68	ДНК ВПЧ тип 59	ДНК ВПЧ тип 51
ПЦР-смесь ВПЧ-3	ДНК ВПЧ тип 58	ДНК ВПЧ тип 52	ДНК ВПЧ тип 33	ДНК ВПЧ тип 56
ПЦР-смесь ВПЧ-4	ДНК ВПЧ тип 39	ДНК ВПЧ тип 31	ДНК ВПЧ тип 66	ДНК экзогенного ВКО

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для калибраторов строится калибровочная кривая, по которой проводится расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномов человека на 1 мл исследуемого образца/реакционную смесь. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Полученные значения концентраций ДНК человека позволяют оценить качество взятия биологического материала. Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВПЧ в 1 мл}}{\text{число копий ДНК человека в 1 мл}} \times 2 * 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВПЧ на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицами 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если получены правильные результаты для контролей в соответствии с таблицей 10;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип ПО» версии 1.0, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения и вкладышу, прилагаемому к набору. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении качественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 для ПЦР-смеси ВПЧ-1 не определено или определено выше граничного значения ⁹	Невалидный
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX для ПЦР-смеси ВПЧ-1 определено не выше граничного значения	ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 45 типа обнаружена соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 для ПЦР-смеси ВПЧ-2 определено не выше граничного значения	ДНК ВПЧ ВКР 35, 68, 59, 51 типа обнаружена соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 для ПЦР-смеси ВПЧ-3 определено не выше граничного значения	ДНК ВПЧ ВКР 58, 52, 33, 56 типа обнаружена соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX для ПЦР-смеси ВПЧ-4 определено не выше граничного значения	ДНК ВПЧ ВКР 39, 31, 66 типа обнаружена соответственно
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 для ПЦР-смеси ВПЧ-1 и ПЦР-смеси ВПЧ-4 определено не выше граничного значения, а для ПЦР-смеси ВПЧ-2 и ПЦР-смеси ВПЧ-3 не определено и значение Ct по каналам FAM, R6G и ROX для всех ПЦР-смесей не определено	ДНК ВПЧ ВКР не обнаружена

Таблица 9

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 в пробирках с ПЦР-смесью ВПЧ-1 (ДНК человека) отсутствует или определено выше граничного ⁹ , или определено, но при этом рассчитанное количество клеток человека в исследуемом образце менее 500 в реакцию, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 в пробирке с ПЦР-смесью ВПЧ-4 (ВКО) отсутствует или определено выше граничного	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 в пробирках с ПЦР-смесью ВПЧ-1 (ДНК человека), отсутствует или определено выше граничного значения, или определено, но при этом рассчитанное количество клеток человека в исследуемом образце менее 500 в реакцию, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 в пробирке с ПЦР-смесью ВПЧ-4 (ВКО) определено не выше граничного	Невалидный! Недостаточное количество материала для анализа
Значение Ct по всем каналам для ВПЧ отсутствует, значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 в пробирках с ПЦР-смесью ВПЧ-1 (ДНК человека) определено не выше граничного, но при этом рассчитанное количество клеток человека в исследуемом образце более 500 в реакцию	ДНК выявляемых ВПЧ не обнаружена
Менее 3 Ig (ВПЧ на 10 ⁵ клеток человека)	Суммарная концентрация ВПЧ < 3 Ig, низкий риск развития дисплазии
Выше 3 Ig (ВПЧ на 10 ⁵ клеток человека) ¹⁰	Суммарная концентрация ВПЧ ≥ 3 Ig, высокий риск развития дисплазии

⁹ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

¹⁰ При наличии высокой вирусной нагрузки ВПЧ, возможно отсутствие положительного сигнала по каналу для флуорофора Cy5 (в пробирках с ПЦР-смесью ВПЧ-4 (ДНК ВКО)).

Результаты для контролей

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G/ HEX /JOE/VIC	ROX	Sy5
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует во всех 4-х ПЦР-смесях	Значение Ct отсутствует во всех 4-х ПЦР-смесях	Значение Ct отсутствует во всех 4-х ПЦР-смесях	Значение Ct отсутствует во всех ПЦР-смесях, кроме ПЦР-смеси ВПЧ-4. Определено значение Ct меньше граничного ¹¹ для ПЦР-смеси ВПЧ-4
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует во всех 4-х ПЦР-смесях			
К1 ВПЧ генотип (К1)	Определено значение Ct			
К2 ВПЧ генотип (К2)	Определено значение Ct не выше граничного			
К1 ВПЧ генотип (К1) К2 ВПЧ генотип (К2)	Показатель эффективности (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2			

Примечание - Валидность образца К- оценивается в ручном режиме в ПО амплификатора. При наличии значения порогового цикла (Ct) по какому-либо из каналов требуется повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля (ОК или К-) по каналу для флуорофора FAM, R6G/HEX/JOE/VIC, ROX и Sy5 (по каналу Sy5 для всех смесей, кроме ПЦР-смеси ВПЧ-4 (ДНК ВКО)) определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Если показатель эффективности E для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного

¹¹ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.4. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор и исследование биологического материала.

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения¹²

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Тип ВПЧ	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
ВПЧ 16	1×10^3	$6,71 \times 10^2 - 1,89 \times 10^3$
ВПЧ 18	1×10^3	$6,70 \times 10^2 - 1,72 \times 10^3$
ВПЧ 31	1×10^3	$7,97 \times 10^2 - 1,59 \times 10^3$
ВПЧ 33	1×10^3	$7,97 \times 10^2 - 1,58 \times 10^3$
ВПЧ 35	1×10^3	$6,70 \times 10^2 - 1,70 \times 10^3$
ВПЧ 39	1×10^3	$7,52 \times 10^2 - 1,51 \times 10^3$
ВПЧ 45	1×10^3	$9,65 \times 10^2 - 1,68 \times 10^3$
ВПЧ 51	1×10^3	$6,89 \times 10^2 - 2,19 \times 10^3$

¹² Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК ВПЧ ВКР, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Тип ВПЧ	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
ВПЧ 52	1×10^3	$7,55 \times 10^2 - 1,35 \times 10^3$
ВПЧ 56	1×10^3	$6,77 \times 10^2 - 1,17 \times 10^3$
ВПЧ 58	1×10^3	$6,89 \times 10^2 - 1,15 \times 10^3$
ВПЧ 59	1×10^3	$9,20 \times 10^2 - 2,21 \times 10^3$
ВПЧ 66	1×10^3	$6,70 \times 10^2 - 1,46 \times 10^3$
ВПЧ 68	1×10^3	$6,35 \times 10^2 - 1,18 \times 10^3$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от 3×10^3 до 3×10^8 копий/мл. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК ВПЧ ВКР типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов (см. таблицу 12) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл и геномную ДНК человека вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора типы ВПЧ. Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми типами ВПЧ.

Таблица 12

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизм	Микроорганизм
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria meningitides</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Staphylococcus agalactiae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella abony</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	–

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений с помощью набора оценивали путем тестирования модельных образцов биологического материала, содержащих ДНК выявляемых типов ВПЧ в трех диапазонах концентраций (см. таблицу 13 и 14). Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК выявляемых типов ВПЧ, в биологическом материале, не содержащем ДНК выявляемых типов ВПЧ. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 16 повторях, для оценки воспроизводимости – в 32 повторях.

Таблица 13

Повторяемость измерения

Тип ВПЧ	Концентрация, укладываемая в диапазон, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, \log_{10}	Стандартное отклонение (SD), \log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 16	от 1×10^4 до 3×10^4	4,10	0,10	2,44
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,25	0,08	1,44
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,20	0,06	1,01
ВПЧ 18	от 1×10^4 до 3×10^4	4,07	0,12	3,12
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,02	0,10	1,93
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,00	0,09	1,57
ВПЧ 45	от 1×10^4 до 3×10^4	4,08	0,10	2,57
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,21	0,08	1,46
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,17	0,07	1,16
ВПЧ 35	от 1×10^4 до 3×10^4	4,35	0,05	1,19
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,45	0,07	1,37
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,43	0,08	1,22
ВПЧ 68	от 1×10^4 до 3×10^4	4,39	0,10	2,24
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,46	0,09	1,67
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,42	0,07	1,01
ВПЧ 59	от 1×10^4 до 3×10^4	4,44	0,13	2,93
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,48	0,13	2,30
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,39	0,13	2,02
ВПЧ 51	от 1×10^4 до 3×10^4	4,45	0,07	1,56
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,44	0,07	1,28
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,44	0,07	1,06
ВПЧ 58	от 1×10^4 до 3×10^4	4,40	0,06	1,27
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,46	0,04	0,74
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,43	0,05	0,83
ВПЧ 52	от 1×10^4 до 3×10^4	4,41	0,06	1,28
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,42	0,04	0,66
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,41	0,06	0,95
ВПЧ 33	от 1×10^4 до 3×10^4	4,47	0,06	1,35
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,48	0,05	0,87
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,41	0,04	0,58

Тип ВПЧ	Концентрация, укладываемая в диапазон, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, \log_{10}	Стандартное отклонение (SD), \log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 56	от 1×10^4 до 3×10^4	4,47	0,04	0,96
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,40	0,06	0,99
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,40	0,06	0,93
ВПЧ 39	от 1×10^4 до 3×10^4	4,39	0,08	1,73
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,47	0,10	1,71
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,46	0,10	1,55
ВПЧ 31	от 1×10^4 до 3×10^4	4,48	0,03	0,65
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,44	0,06	1,06
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,47	0,06	0,87
ВПЧ 66	от 1×10^4 до 3×10^4	4,24	0,08	1,88
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,38	0,08	1,44
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,40	0,07	1,06

Таблица 14

Воспроизводимость измерения

Тип ВПЧ	Концентрация, укладываемая в диапазон, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, \log_{10}	Стандартное отклонение (SD), \log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 16	от 1×10^4 до 3×10^4	4,08	0,10	2,40
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,21	0,08	1,60
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,21	0,06	0,95
ВПЧ 18	от 1×10^4 до 3×10^4	4,06	0,14	3,52
	от 1×10^5 до 3×10^5	4,48	0,11	2,14
	от 1×10^6 до 3×10^6	5,39	0,09	1,52
ВПЧ 45	от 1×10^4 до 3×10^4	4,07	0,10	2,35
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,19	0,08	1,54
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,17	0,07	1,09
ВПЧ 35	от 1×10^4 до 3×10^4	4,26	0,13	3,10
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,37	0,10	1,94
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,38	0,08	1,23
ВПЧ 68	от 1×10^4 до 3×10^4	4,33	0,11	2,56
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,40	0,10	1,85
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,38	0,07	1,11
ВПЧ 59	от 1×10^4 до 3×10^4	4,44	0,10	2,23
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,41	0,10	1,76
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,42	0,10	1,53
ВПЧ 51	от 1×10^4 до 3×10^4	4,42	0,07	1,67
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,41	0,07	1,30
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,43	0,06	0,91
ВПЧ 58	от 1×10^4 до 3×10^4	4,56	0,11	2,48
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,46	0,09	1,53
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,41	0,06	0,96
ВПЧ 52	от 1×10^4 до 3×10^4	4,45	0,07	1,48
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,46	0,06	1,03
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,44	0,06	0,97
ВПЧ 33	от 1×10^4 до 3×10^4	4,40	0,05	1,21
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,39	0,05	0,81
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,41	0,05	0,72
ВПЧ 56	от 1×10^4 до 3×10^4	4,43	0,07	1,54
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,42	0,05	0,91
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,42	0,06	0,85
ВПЧ 39	от 1×10^4 до 3×10^4	4,40	0,07	1,58
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,48	0,08	1,48
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,47	0,09	1,35
ВПЧ 31	от 1×10^4 до 3×10^4	4,40	0,04	0,95
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,45	0,05	0,88
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,40	0,05	0,76
ВПЧ 66	от 1×10^4 до 3×10^4	4,26	0,07	1,69

Тип ВПЧ	Концентрация, укладываемая в диапазон, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, \log_{10}	Стандартное отклонение (SD), \log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
	от 1×10^5 до 3×10^5	5,39	0,06	1,13
	от 1×10^6 до 3×10^6	6,42	0,06	0,86

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» была определена путем тестирования стандартного образца предприятия в 40 повторах (см. таблицу 15).

Таблица 15

Правильность измерения

Тип ВПЧ	Среднее значение измерения, \log_{10}	Установленное значение концентрации, \log_{10}	Систематическая погрешность (В)	
			\log_{10}	%
ВПЧ 16	5,25	5,70	-0,45	-7,89
ВПЧ 18	5,02	5,70	-0,68	-11,92
ВПЧ 45	5,21	5,70	-0,49	-8,6
ВПЧ 35	5,36	5,70	-0,34	-5,96
ВПЧ 68	5,34	5,70	-0,36	-6,32
ВПЧ 59	5,47	5,70	-0,23	-4,04
ВПЧ 51	5,29	5,70	-0,41	-7,19
ВПЧ 58	5,51	5,70	-0,19	-3,33
ВПЧ 52	5,35	5,70	-0,35	-6,14
ВПЧ 33	5,42	5,70	-0,28	-4,91
ВПЧ 56	5,48	5,70	-0,22	-3,86
ВПЧ 39	5,28	5,70	-0,42	-7,37
ВПЧ 31	5,27	5,70	-0,43	-7,54
ВПЧ 66	5,27	5,70	-0,43	-7,54

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и чувствительности набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» были использованы 500 образцов отделяемого слизистой оболочки влагалища (мазки) (в транспортной среде для мазков), 200 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (в транспортной среде для мазков), 500 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии (в том числе с гистологически подтвержденной дисплазией средней степени и выше (CIN2+)), 200 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы), 195 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

В качестве референтного метода, с помощью которого устанавливали наличие или отсутствие ДНК ВПЧ ВКР, использовались следующие наборы реагентов:

– Набор реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики *in vitro* "АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL" по ТУ 9398-226-01897593-2016 (ПУ № РЗН 2017/6533),

– Набор реагентов для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный) по ТУ 9398-320-23548172-2011 (ПУ № ФСР 2012/13457),

– Набор реагентов для выявления ДНК вируса папилломы человека 66 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВПЧ 66) по ТУ 9398-512-23548172-2015 (ПУ № РЗН 2016/4013),

– Набор реагентов для выявления ДНК вируса папилломы человека 68 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВПЧ 68) по ТУ 9398-426-23548172-2013 (ПУ № РЗН 2015/2297).

Таблица 16

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип	Набор сравнения
Отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазок) в транспортной среде для мазков	500	Положительных	149	149
		Отрицательных	351	351
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для мазков	200	Положительных	101	101
		Отрицательных	99	99
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии (в том числе с гистологически подтвержденной дисплазией средней степени и выше (CIN2+))	500	Положительных	162	162
		Отрицательных	338	338
Соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы)	200	Положительных	101	101
		Отрицательных	99	99
Соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	195	Положительных	98	98
		Отрицательных	97	97

Значения диагностической специфичности и чувствительности набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные исходя из полученных данных, приведены в таблице 17.

Диагностические характеристики набора

Тип образцов	Диагностическая специфичность, %	Диагностическая чувствительность, %
Отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазок) в транспортной среде для мазков	99,2 – 100	98,0 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для мазков	97,0 – 100	97,1 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии	99,1 – 100	98,2 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы)	97,0 – 100	97,1 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	97,0 – 100	97,0 – 100

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ и ДНК человека

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища и образцам отделяемого слизистой оболочки прямой кишки на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 18, в максимально возможной концентрации для данных видов биоматериала.

Таблица 18

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
отделяемое слизистой оболочки влагалища	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл
	лубриканты	5 мкг/100 мкл
	семенная жидкость	5 мкг/100 мкл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	итраконазол	6,5 мкг/100 мкл
	метронидазол	5 мкг/100 мкл
	дидрогестерон	5 мкг/100 мкл
	прогестерон	5 мкг/100 мкл
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	гликохолат натрия	11,1 нг/100 мкл
	натрий таурохолат гидрат	3,8 нг/100 мкл
	хлорофилл	0,26 мкг/100 мкл

Также при использовании набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища искусственно-синтезированной ДНК человека в максимально возможной концентрации ($3,0 \times 10^6$ копий/100 мкл) для данного вида биоматериала.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционные смеси, приготовленные из ПЦР-смесей ВПЧ и Буфера В, хранению не подлежат.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 генотип» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света