УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.В.Малеев
«30» 09 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для количественного определения ДНК вирусов 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 скрин-титр-14-FL»

АмплиСенс®

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК 18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 19
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 20
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN) 21
СОСТАВ 21
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 21
А. Подготовка пробирок для амплификации 21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 22
В. Анализ и интерпретация результатов 24
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 29
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 29

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β-глобинового гена человека)
ВПЧ ВКР	- вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфат
К1, К2	- ДНК-калибраторы
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
РШМ	- рак шейки матки
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ADC	- железисто-плоскоклеточный рак шейки матки
AIS	- аденокарцинома шейки матки in situ
CIN2	- дисплазия средней степени тяжести
CIN2+	- дисплазия средней и высокой степени, РШМ
CIN3	- дисплазия высокой степени
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HC	- Hybrid Capture (метод гибридного захвата)
SCC	- плоскоклеточный рак шейки матки

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» предназначен для количественного определения ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов в биологическом материале (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса)) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов позволяет отдельно определять ДНК ВПЧ 16, 18 и 45 генотипов. ВПЧ ВКР являются главной этиологической причиной развития РШМ и предшествующей ему тяжелой дисплазии. ВПЧ обнаруживается в 95% случаев РШМ, из них 16, 18, 45 генотипы в совокупности являются причиной 75% плоскоклеточных раков и 94% аденокарцином шейки матки. Набор реагентов позволяет определять суммарное количество ДНК

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВПЧ всех 14 генотипов, и, кроме того, отдельно определять ДНК ВПЧ 16, 18 и 45 генотипов.

Известно, что развитие РШМ часто ассоциировано с интеграцией ДНК вируса в геном клетки-хозяина. Наиболее часто интегрируют ВПЧ 16 и 18 генотипов, при этом происходит разрыв участка E1/E2 при сохранении онкогена E6/E7. Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» разработан таким образом, что по разным каналам прибора детектируются разные участки генома ВПЧ 16, 18 и 45 типов. Выявление области E6 при отсутствии области E1/E2 позволяет косвенно судить о возможности интеграции вируса в геном человека.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного в ходе скрининговых исследований или от лиц с подозрением на папилломавирусную инфекцию вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых генотипов ВПЧ ВКР и ДНК β-глобинового гена человека с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ДНК β-глобинового гена используется в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО Glob) и позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. ВКО Glob, являясь участком генома человека, должен всегда присутствовать в исследуемом образце в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток человека в образце (500 – 10^5 клеток/реакцию).

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК ВПЧ ВКР при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые 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 методом ПЦР в режиме «реального времени» 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*). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Концентрация ДНК ВПЧ рассчитывается как соотношение количества копий ВПЧ на количество клеток эпителия слизистых оболочек человека.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. 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 дезоксиуридинтрифосфат 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.

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

Определение ДНК генотипов ВПЧ ВКР (с отдельным определением 16, 18 и 45 генотипов) для одного образца проводится в одной пробирке, в которой определяются 14 генотипов ВПЧ ВКР и ВКО Glob. Результаты амплификации ДНК ВПЧ ВКР разных генотипов, а также ДНК ВКО Glob регистрируются по 5 различным каналам флуоресцентной детекции:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК ВПЧ ВКР генотип **16**	ДНК ВПЧ ВКР генотип **18**	генотипы **16,18,31,33,35, 39,45,51,52,56, 58,59,66,68**	ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob)	ДНК ВПЧ ВКР генотип **45**
Область амплификации	E6 gene	E6 gene	E1 gene (для генотипов 16,31,33,35,52, 58)/ E2 gene (для генотипов 18,39, 45,56,59,66,68)/ E7 gene (для генотипа 51)	β-глобиновый ген	E6 gene

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность и линейный диапазон измерения

Таблица 2

Вид исследуе-мого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплифика-ции	Микроорга низм	Аналити-ческая чувстви-тельность, копий/мл[1]	Линейный диапазон измерения, копий/мл
Мазок со слизистой оболочки влагалища, Соскоб со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса	«Транспорная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» или «ТС Digene»	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО», «ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN	ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов	$5x10^3$	$7x10^3$ – $1x10^8$
Соскоб со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса)	Транспортно-фиксирующая спиртосодержащая среда для жидкостной цитологии	«АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN	ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов	$5x10^3$	$7x10^3$ – $1x10^8$

[1] Количество копий ДНК вируса в биологическом материале, помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК ВПЧ ВКР заявленных генотипов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Gardnerella vaginalis, Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Atopobium vaginae, Ureaplasma* spp*., Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pyogenes, Candida* spp*., CMV* (цитомегаловирус), *EBV* (вирус Эпштейна-Барр), *VZV* (вирус ветряной оспы), *HSV* I, *HSV* II (вирус простого герпеса типы 1 и 2), ДНК ВПЧ, относящиеся к типам низкого и неопределенного риска, в частности генотипы 6, 11, 67, 70, 84, 81, 82, 62, 72, 73.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций, а также перекрестных реакций между генотипами ВПЧ при использовании высококонцентрированных образцов выявлено не было. Специфичность тестирования подтверждалась методом секвенирования детектируемых фрагментов амплификации.

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования стандартных образцов предприятия в трех диапазонах концентраций (от $7x10^3$ до $1x10^4$, от $1x10^4$ до $1x10^6$, от $1x10^6$ до $1x10^8$ копий/мл).

Таблица 3

Воспроизводимость

Генотип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
16	От $7x10^3$ до $1x10^4$	16	3,55	0,04	1,19
18		16	3,94	0,07	1,71
31		16	3,73	0,09	2,55
33		16	3,68	0,13	3,44
35		16	3,45	0,15	4,30
39		16	3,66	0,12	3,32
45		16	3,65	0,06	1,58
51		16	3,50	0,14	4,09
52		16	3,64	0,11	2,96
56		16	3,78	0,13	3,36
58		16	3,79	0,11	2,86
59		16	3,46	0,09	2,46
66		16	3,88	0,09	2,35
68		16	3,60	0,13	3,53

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

16	От $1x10^4$ до $1x10^6$	16	5,93	0,11	1,93
18		16	6,04	0,07	1,23
31		16	3,94	0,18	4,61
33		16	4,35	0,13	2,88
35		16	5,61	0,12	2,16
39		16	5,18	0,12	2,22
45		16	5,77	0,15	2,66
51		16	5,60	0,17	3,03
52		16	5,37	0,20	3,68
56		16	5,80	0,23	3,90
58		16	5,64	0,09	1,56
59		16	5,19	0,12	2,33
66		16	5,41	0,14	2,54
68		16	5,18	0,03	0,59
16	От $1x10^6$ до $1x10^8$	16	7,71	0,50	6,41
18		16	7,92	0,09	1,19
31		16	6,30	0,23	3,72
33		16	6,40	0,05	0,72
35		16	7,60	0,27	3,51
39		16	7,23	0,10	1,35
45		16	7,80	0,22	2,81
51		16	7,48	0,08	1,04
52		16	7,50	0,14	1,86
56		16	7,64	0,16	2,10
58		16	7,52	0,04	0,54
59		16	6,70	0,37	5,46
66		16	7,30	0,28	3,83
68		16	7,10	0,04	0,55

Таблица 4

Повторяемость

Генотип ВПЧ	**Исходное значение концентрации, копий/мл**	**Количество повторов**	**Среднее значение концентрации, lg**	**Стандартное отклонение (SD)**	**Коэффициент вариации (CV), %**
16	От $7x10^3$ до $1x10^4$	8	3,56	0,04	1,18
18		8	3,91	0,06	1,50
31		8	3,78	0,05	1,19
33		8	3,57	0,03	0,95
35		8	3,33	0,07	2,18
39		8	3,56	0,08	2,19
45		8	3,61	0,03	0,84
51		8	3,37	0,04	1,09
52		8	3,58	0,10	2,76
56		8	3,68	0,08	2,13
58		8	3,70	0,08	2,07
59		8	3,41	0,08	2,40
66		8	3,81	0,06	1,61
68		8	3,51	0,07	2,12
16	От $1x10^4$ до $1x10^6$	8	5,88	0,13	2,19
18		8	5,99	0,07	1,13
31		8	3,89	0,24	6,21
33		8	4,46	0,02	0,49
35		8	5,71	0,08	1,38

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Генотип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
39		8	5,08	0,09	1,77
45		8	5,67	0,15	2,60
51		8	5,75	0,06	0,97
52		8	5,73	0,08	1,43
56		8	5,64	0,23	4,06
58		8	5,58	0,08	1,44
59		8	5,13	0,08	1,64
66		8	5,28	0,04	0,75
68		8	5,18	0,03	0,58
16	От $1x10^6$ до $1x10^8$	8	8,04	0,11	1,38
18		8	8,01	0,04	0,54
31		8	6,50	0,05	0,77
33		8	6,40	0,03	0,54
35		8	7,38	0,05	0,67
39		8	7,33	0,03	0,41
45		8	8,00	0,05	0,68
51		8	7,45	0,07	0,98
52		8	7,26	0,05	0,71
56		8	7,67	0,18	2,34
58		8	7,55	0,02	0,24
59		8	6,37	0,05	0,80
66		8	7,05	0,15	2,14
68		8	7,14	0,03	0,38

Правильность была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в концентрации порядка $1x10^4$ копий/мл.

Таблица 5

Правильность

Генотип ВПЧ	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение, lg	Систематическая погрешность (B), %
16	40	4,13	4,25	2,86
18	40	4,28	4,45	3,96
31	40	4,42	4,28	3,35
33	40	4,60	4,44	3,56
35	40	4,29	4,46	3,80
39	40	4,07	4,33	6,20
45	40	4,10	4,44	7,69
51	40	4,34	4,40	1,38
52	40	4,41	4,45	0,81
56	40	4,30	4,32	0,55
58	40	4,30	4,38	1,77
59	40	4,10	4,47	8,12
66	40	4,62	4,52	2,21
68	40	4,40	4,41	0,30

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики набора «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» определялись согласно международным требованиям по валидации новых тестов по выявлению ДНК ВПЧ[2]:

Согласно международным требованиям по валидации новых тестов по выявлению ДНК ВПЧ **диагностическая чувствительность** ВПЧ теста в выявлении CIN2+ должна быть не менее 90% чувствительности метода Hybrid Capture 2 (HC2) (Digene hc2 High-Risk *HPV* DNA Test) – т.е. относительная чувствительность не менее 90%, образцы должны быть гистологически подтвержденными – не менее CIN2. Должно быть протестировано не менее 60 образцов с помощью двух ВПЧ тестов.

Согласно международным требованиям по валидации новых тестов по выявлению ДНК ВПЧ **диагностическая специфичность** ВПЧ теста в выявлении CIN2+ должна быть не менее 98% специфичности метода Hybrid Capture 2 (HC2) (Digene hc2 High-Risk *HPV* DNA Test). В выборку должно быть включено не менее 800 образцов от женщин, которым исполнилось 30 лет, у которых нет цитологически/гистологически подтвержденной CIN2.

Для определения диагностических характеристик набора были использованы 900 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала. Из них 100 образцов – с гистологически подтвержденным диагнозом CIN2, со средним возрастом пациенток – 35 лет (диапазон от 30 до 65 лет). А также 800 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала с цитологически/гистологически подтвержденным отсутствием CIN2 , полученные при скрининговом исследовании. Средний возраст женщин – 39 лет (диапазон от 30 до 65 лет).

Кроме того, исследовано 300 образцов мазков со слизистой оболочки влагалища, полученных при скрининговом исследовании.

[2] Meijer CJ, et al. 2009. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in woman 30 years and older/ Int. J. Cancer 124:516-520.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 6

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин титр-14-FL»		Результаты применения референтных методов[3]	
			Положительных	Отрицательных
Соскоб со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса) с гистологически подтвержденной дисплазией средней степени и выше (CIN2+)	Всего исследовано 100 образцов	**Положительных**	100	0
		Отрицательных	0	0
Соскоб со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса) с цитологической нормой или дисплазией легкой степени	Всего исследовано 800 образцов	**Положительных**	156	0
		Отрицательных	0	644
Мазок со слизистой оболочки влагалища	Всего исследовано 300 образцов	**Положительных**	147	0
		Отрицательных	0	153

Таблица 7

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность[4] (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность[5], (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале (%)
Соскоб со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса)	98,0 - 100,0	98,0 – 100,0
Мазок со слизистой оболочки влагалища	97,5 - 100,0	99,0 – 100,0

[3] В качестве референтных методов использовались наборы реагентов:
- Digene hc2 High-Risk HPV DNA Test, РУ № ФСР 2010/06595 (при исследовании соскобов со слизистой оболочки цервикального канала (эндоцервикс и эктоцервикс)),
- «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин титр-FL», РУ № ФСР 2008/02567, «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL», РУ №ФСР 2008/02564 (для всех типов образцов),
- Секвенирование методом Сенгера участка L1 генома ВПЧ (для дискордантных образцов).

[4] Относительная чувствительность в сравнении с использованными референтными методами.

[5] Относительная специфичность в сравнении с использованными референтными методами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[6], биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого,

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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[7]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов 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.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

<u>Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:</u>

[7] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514), «Транспортная среда для мазков (ТС)» (РУ № ФСР 2009/05515), транспортно-фиксирующая спиртосодержащая среда для жидкостной цитологии (например, PreservCyt Hologic Inc, ("Холоджик Инк.") США, РУ № ФСЗ 2012/11752) или другие рекомендованные Производителем).
2. Набор для взятия цервикальных проб DNAPAP Cervical Sampler из набора реагентов Digene *HPV* test (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, РУ № ФСЗ 2010/06595)
3. Щетка эндоцервикальная (например, Rovers Cervex-Brush Combi, Rovers Medical Devices B.V., «Роверс Медикал Девайсез Б.В.» Нидерланды или аналогичная).
4. Зонд гинекологический комбинированный (например, ЗГК «ЦМ», Россия или аналогичный).
5. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные)

Предварительная подготовка исследуемого материала

6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 и 5,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия) или аналогичные).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

12. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-АМ» вариант 50 или вариант 100 (РУ № ФСР 2007/00183), «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО», «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» или другие рекомендованные Производителем.
13. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

14. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
    а) одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной (например. Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
    в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
16. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
17. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
18. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
19. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
20. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

в режиме «реального времени», имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем).

21. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
22. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
23. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

– мазки со слизистой оболочки влагалища;
– соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала.

Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или комбинированного зонда в пробирку с транспортной средой из заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

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

Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Доступ к цервикальному каналу обеспечить с помощью одноразового или многоразового стерильного гинекологического зеркала. Взятие материала провести

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

с помощью цервикальной цитощетки или комбинированного гинекологического зонда в пробирку с транспортной средой. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном (допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови).

Способы взятия соскобов эпителия:

Первый способ – используется цервикальная цитощетка (одна или две) и пробирка с 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» (форма комплектации 2). Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый одной цервикальной цитощеткой, и/или соскоб эпителия с поверхности шейки матки (эктоцервикс), взятый второй цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой.

Второй способ – используется набор для взятия цервикальных проб - DNAPAP Cervical Sampler (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), содержащий цервикальную цитощетку и пробирку с транспортной средой Digene. Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) поместить в пробирку с транспортной средой.

Третий способ – используется комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/эктоцервикса в «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)». Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс и эктоцервикс) поместить в пробирку на 5 мл с предварительно внесенной транспортной средой в объеме 2,0 мл.

Четвертый способ – используется комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/эктоцервикса и банку с транспортно-фиксирующей средой для жидкостной цитологии (например, PreservCyt (Hologic Inc. («Холоджик Инк.»), США, или аналогичная). Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс и эктоцервикс) поместить в пробирку с транспортной средой.

Рабочую часть цитощетки/зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть цитощетки следует максимально полно смыть биоматериал с их рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 7 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала;
- в транспортно-фиксирующей среде для жидкостной цитологии при температуре от 18 до 25 °С - в течение года.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Образцы мазков со слизистой оболочки влагалища и соскобов со слизистой оболочки цервикального канала, взятые в «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» или транспортную среду Digene не требуют предварительной подготовки.

Образцы цервикальных соскобов, взятые в транспортно-фиксирующую спиртосодержащую среду для жидкостной цитологии требуют предварительной подготовки (концентрирование эпителиальных клеток).

ВНИМАНИЕ! Отбирать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР нужно только одноразовыми наконечниками с фильтром и только в одноразовую пробирку. Важно, чтобы первой отбиралась аликвота клеток для ПЦР-исследования, второй – для проведения жидкостной цитологии.

Концентрирование эпителиальных клеток.

Способ первый

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл, равное количеству исследуемых образцов, промаркировать. Каждую баночку с образцом для жидкостной цитологии интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток, затем аккуратно открыть и перенести **2-5 мл клеток** (в зависимости от плотности клеточной суспензии) в приготовленные пробирки.
2. Оставить пробирки в штативе при температуре от 18 до 25 °С на ночь для оседания клеток или центрифугировать на микроцентрифуге **10 мин** при **0,6 тыс g** (например, 3 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Не захватывая клеточный осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 1000 мкл, используя автоматический дозатор.
4. Оставшиеся примерно 1 мл осадка с надосадочной жидкостью аккуратно перенести в чистую пробирку на 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром, промаркировать и центрифугировать на микроцентрифуге при **10 тыс g** (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)) в течение **2 мин**.
5. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Оставить **100-200 мкл осадка** с надосадочной жидкостью.

Способ второй

1. Баночки с образцами для жидкостной цитологии интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на ночь для оседания клеток.
2. Автоматическим дозатором на 1000 мкл отобрать 0,5 – 1,0 мл клеток со дна баночки и перенести в чистую пробирку на 1,5 мл, промаркировать.
3. Центрифугировать на микроцентрифуге при **10 тыс g** (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)) в течение **2 мин**.
4. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Оставить **100-200 мкл** осадка с надосадочной жидкостью.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови и гноя может приводить к ингибированию реакции амплификации.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов, рекомендованные Производителем:

- «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» для экстракции ДНК из мазков со слизистой оболочки влагалища и образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, взятого для анализа первым, вторым и третьим способом, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» для экстракции ДНК из образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, взятого для анализа четвертым способом (образцы жидкостной цитологии), в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.
- «ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из мазков со слизистой оболочки влагалища и образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, взятого для анализа первым, вторым и третьим способом в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»:

ВНИМАНИЕ! Добавления внутреннего контрольного образца не требуется.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»:

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ»:

ВНИМАНИЕ! Добавления внутреннего контрольного образца не требуется.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК ВПЧ ВКР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ВПЧ 14	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
К1 ВПЧ скрин	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 ВПЧ скрин	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К−	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

Шаблон расчета результатов в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL ВПЧ 14** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на несколько реакций.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL ВПЧ 14**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL ВПЧ 14, ПЦР-буфером-Н,** осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL ВПЧ 14** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:
   а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К1 ВПЧ скрин**.
   б) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 ВПЧ скрин**.
   в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9)[8].

[8] Программы амплификации (табл. 8, 9) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 8

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного[9] и планшетного[10] типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала 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, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5**	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50°С – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»

	Приборы роторного типа[9]			**Приборы планшетного типа[10]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE**, **ROX**, **Cy5.5** и **Cy5**.

ВНИМАНИЕ! Программа **«АмплиСенс-1»** (см. табл. 9) является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс» для выявления и генотипирования вирусов папилломы человека (ВПЧ ВКР) и выявления ДНК возбудителей ИППП. Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

[9] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем
[10] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Для удобства работы рекомендуется использовать прилагаемый шаблон расчета результатов в формате Microsoft Excel.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВПЧ ВКР **16** генотипа	ДНК ВПЧ ВКР **18** генотипа	ДНК ВПЧ ВКР (генотипы 16,18, 31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,66,68)	ДНК ВКО Glob	ДНК ВПЧ ВКР **45** генотипа

Результаты интерпретируются 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.

На основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет концентраций ДНК ВПЧ и ДНК человека в копиях/реакцию. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на $1x10^5$ клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека позволяют оценить качество взятия биологического материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят согласно формуле:

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

При расчете суммарного количества ДНК ВПЧ учитывается, что сигналы по каналам FAM, JOE, Cy5.5 показывают индивидуальные концентрации ВПЧ 16, 18 и 45 генотипов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибратора **К1** в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» путем экспорта полученных для ДНК-калибратора **К1** результатов с помощью программного обеспечения прибора. В этом случае необходима постановка только ДНК калибратора **К2.**

Расчет результатов с использованием готового шаблона «ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» в формате Microsoft Excel:

Для автоматической обработки исходных данных и получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие условия:

1. Заполнение таблицы ***Данные прибора*** должно проводиться без ошибок, с соответствующим обозначением контрольных образцов.
2. Необходимо убедиться, что система безопасности Microsoft Excel позволяет использовать макросы. В меню ***Сервис>Макрос>Безопасность*** установите ***Средний уровень защиты***.

Выполнение автоматической обработки исходных данных

1. Открыть файл с шаблоном, принять включение макросов.
2. Проверить что активна кнопка ***Рассчитать.***
3. Если таблица заполнена данными из предыдущей постановки, ее можно очистить путем нажатия кнопки ***Очистка таблицы.***
4. Заполнить таблицу ***Данные прибора*** путем копирования значений пороговых циклов по каждому каналу детекции непосредственно из программного обеспечения прибора, либо из файла экспорта данных в Microsoft Excel.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Обозначить контрольные образцы в соответствии с таблицей ***Принятые в программе условные обозначения*** на вкладке ***Инструкция***. Язык и регистр букв значения не имеет.
6. Обозначить пустые ячейки, для которых не проводится анализ, знаком **#**. Это можно сделать путем нажатия кнопки ***Обозначить неподписанные образцы как пустые***.
7. Заполнить информацию о постановке.
8. Сохранить файл под другим именем.
9. Нажать кнопку ***Рассчитать***. В файле будут отражены данные калибровочных линий, расчетные концентрации, результаты (количественный результат, расшифровка).
10. Проверить, что калибровка проведена успешно: в таблице ***Калибровка*** в графе ***Статус калибровки*** указано сообщение ***Ок*** по каждому из каналов.
11. Просмотреть статус образцов, особое внимание обратить на контрольные образцы.
12. Интерпретацию результатов проводить в соответствии с таблицей 11.

Использование результатов, полученных для ДНК-калибратора К1 в предыдущей постановке

Заполнить таблицу ***Данные прибора***, нажать кнопку ***Рассчитать***. Проверить статус калибровки (в таблице ***Калибровка*** в графе ***Статус калибровки*** для каждого канала должно стоять сообщение ***Ок***) и нажать кнопку ***Сохранить калибровку***.

При следующей постановке заполнить таблицу **Данные прибора** данными, полученными для исследуемых образцов, ДНК-калибратора К2, отрицательных контролей и нажать кнопку ***Применить калибровку***. После этого сохранённые значения *Ct* появятся в нижних ячейках, обозначенных серым цветом. Далее нажать кнопку ***Рассчитать*** и провести учет результатов, как описано выше.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Заключение	Расшифровка
Невалидный (Недостаточное количество биологического материала)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее $1x10^3$ копий/реакция (500 клеток/реакция, и отсутствуют значения рассчитанных концентраций ДНК ВПЧ ВКР по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5.5. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование.
ДНК ВПЧ ВКР не выявлена	Значение *Ct* для ДНК ВПЧ ВКР отсутствует, а концентрация ВКО Glob более $1x10^3$ копий/реакция (500 клеток/реакция). Результат выдается как **ДНК ВПЧ ВКР не выявлена**.
менее 3 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	Клинически малозначимая величина
3–5 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	Клинически значимая величина. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
более 5 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	Клинически значимая, повышенная величина. Высокая вероятность наличия дисплазии
Интеграция? (только для 16, 18 и 45 генотипов)	Выявление области E6 при отсутствии области E1/E2 косвенно предполагает вероятность интеграции вируса в ДНК человека

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК, К-	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Для ДНК-калибраторов К1, К2 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. Показатель эффективности Е при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (*Ct*), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВПЧ 14 хранить в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2 (тел. (495) 664-28-84, факс (495) 664-28-89, e-mail: cs@ilslab.ru)[10]

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
УДП РФ — Е.В.Ржевская

[10] Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		Беречь от влаги

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru