«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

_____ В.Г. Акимкин

«18» июня 2018 г.

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

## «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-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

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 2х.

**Форма 2** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 3х.

**Форма 3** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 2х.

**Форма 4** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 3х.

**ВНИМАНИЕ!** Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3** и **4** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

При работе с формами 2 и 4 для детекции используется **трёхканальный** флуоресцентный ПЦР-детектор.

## СОСТАВ

**Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100** – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **Лизирующий раствор** | Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого или розового цвета [1] | 30 | 1 флакон |
| **Отмывочный раствор** | Прозрачная бесцветная жидкость | 100 | 1 флакон |
| **Сорбент универсальный** | Суспензия от белого до темно-бежевого цвета | 1,0 | 2 пробирки |
| **ТЕ-буфер для элюции ДНК** | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 2 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из 100 проб, включая контроли.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 2х** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вирусов

[1] При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.



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

папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 типов с отдельным определением ВПЧ 16 типа с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1** (на 30 реакций) | Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета | 0,21 | 4 пробирки синяя крышка |
| **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-2** (на 30 реакций) | Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета | 0,21 | 4 пробирки зеленая крышка |
| **ПЦР-буфер-Flu** (на 56 реакций) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,42 | 4 пробирки |
| **Полимераза (TaqF)** (на 56 реакций) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,028 | 4 пробирки |
| **ПЦР-смесь-Фон ВПЧ** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,8 | 1 пробирка |
| **Минеральное масло для ПЦР** | Бесцветная вязкая жидкость | 4,0 | 1 пробирка |
| **ПКО ДНК ВПЧ 16, 31, 33 типов и ДНК человека** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 2 пробирки |
| **ТЕ-буфер** | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 5 пробирок |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 120 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец (ОКО) этапа выделения:

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ОКО** | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

**К комплекту реагентов на цифровом носителе прилагается или находится на официальном сайте изготовителя:**

– программное обеспечение в формате Microsoft® Excel для автоматической обработки результатов.



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

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 3х** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 типов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ 3х** (на 30 реакций) | Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета | 0,21 | 4 пробирки |
| **ПЦР-буфер-Flu** (на 56 реакций) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,42 | 2 пробирки |
| **Полимераза (TaqF)** (на 56 реакций) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,028 | 2 пробирки |
| **ПЦР-смесь-Фон ВПЧ** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,8 | 1 пробирка |
| **Минеральное масло для ПЦР** | Прозрачная бесцветная жидкость | 4,0 | 1 флакон |
| **ПКО ДНК ВПЧ 16, 31, 33 типов и ДНК человека** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| **ТЕ-буфер** | Прозрачная бесцветная жидкость | 5,0 | 5 пробирок |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 120 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа выделения:

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ОКО** | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL»** предназначен для выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведение ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»



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

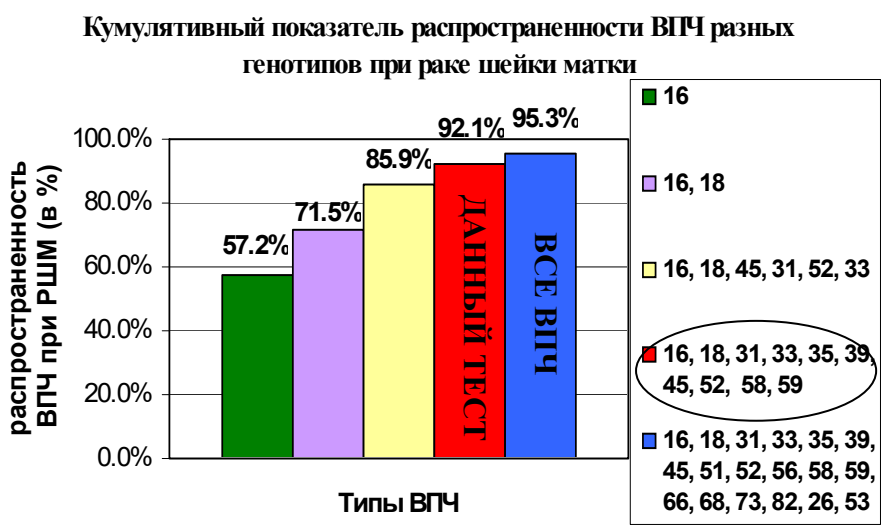
для выделения ДНК из клинического материала производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Набор реагентов рассчитан на выявление *(без определения генотипа)* ДНК ВПЧ 11 типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67. При использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-FEP 2х осуществляется отдельное определение ДНК ВПЧ 16 типа. Эти типы обладают высокой трансформирующей активностью и ответственны более чем за 92 % случаев тяжелых цервикальных дисплазий и рака шейки матки. В наборе реагентов используется эндогенный внутренний контроль (участок β-глобинового гена человека).



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

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ




*N. Muñoz, X.Bosch, 2004*

*Овалом отмечены генотипы, выявляемые набором реагентов* **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL»**

Все установленные на сегодняшний день генотипы ВПЧ высокого канцерогенного риска *(18 генотипов)* ответственны за 95 % случаев рака шейки матки. Выявление небольшого числа генотипов (от 1 до 6) приводит к недостаточной диагностической чувствительности теста (от 72 % для тестов, рассчитанных только на выявление 16 и 18 типов, до 86 %). Выявляемые же набором реагентов 11 наиболее распространенных генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска является достаточным для достижения приемлемой диагностической чувствительности 92 % при сохранении удобного формата исследования.

### Определение клинически-значимого количества вируса с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL»

Современные эпидемиологические данные показывают, что в большинстве случаев при проведении *диспансерного (скринингового) обследования* на наличие диспластических изменений шейки матки, влагалища и вульвы, а так же риска их развития необходимо выявление лишь *клинически-значимого* количества вируса папилломы человека высокого риска. Считается, что выявление вируса в количестве, не превышающем определенное пороговое значение, имеет небольшое клиническое значение, так как практически в 100 % случаев ассоциировано с самостоятельным спонтанным излечением. Напротив, вирусная нагрузка выше порога является свидетельством наличия дисплазии или вероятности ее развития. Однако, в случае, если речь идет не о



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

профилактическом (скрининговом) обследовании, а *о контроле лечения*, выявление вируса даже с низкой нагрузкой может быть ранним маркером рецидива. На сегодняшний день порогом клинически значимого количества вируса считается уровень порядка $10^5$ ГЭ ВПЧ ВКР/соскоб цервикального канала и при условии ***стандартности*** ***взятия материала***. В ходе исследований, проведенных при апробации набора реагентов на моделях клинических образцов было показано, что при стандартном заборе соскоба цервикального канала в 0,5 мл транспортной среды, последующего выделения ДНК (при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ»), 100-кратного разведения выделенной ДНК в ТЕ-буфере и проведении ПЦР-анализа с использованием комплекта реагентов для амплификации «ПЦР-комплект» позволяет выявлять только клинически значимое количество вируса. Апробация данной методики на *клинических образцах здоровых пациенток и пациенток с тяжелыми дисплазиями и РШМ* показала повышение специфичности выявления дисплазии на 22,9 % (с 61,7 % без разведений до 84,6 % с разведениями) при сохранении чувствительности выявления тяжелой дисплазии и РШМ на высоком уровне (98,9 %). *Обратите внимание, что порог клинически значимого количества вируса не валидирован для исследования соскобов, полученных у мужчин*.

Таким образом, с использованием **набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL»** существует возможность выявления ВПЧ высокого канцерогенного риска в формате:

- **«Присутствие ВПЧ ВКР»** – исследуется образец непосредственно после выделения;
- **«Клинически значимое количество ВПЧ ВКР»** – исследуется образец после выделения ДНК, разведенный в 100 раз в ТЕ-буфере. Однако следует помнить, что для проведения определения клинически значимого количества вируса материал должен забираться стандартно (см. раздел «Взятие и хранение образцов»).

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) и детекции по «конечной точке» участков ДНК ВПЧ и участка ДНК β-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК одиннадцати типов ВПЧ проводится в одной или двух пробирках в



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

зависимости от варианта набора. Отдельно регистрируются (по разным каналам) результаты амплификации ДНК ВПЧ и внутреннего контроля. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце (цервикальный соскоб) в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток в мазке ($10^3$ – $10^5$ геномов). Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. В случаях, если соскоб эпителия забран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток) сигнал амплификации β-глобинового гена будет заниженным.

## ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Для проведения анализа используется следующий клинический материал:

**У женщин**: образцы эпителия забирают так же, как для цитологического исследования:

**Первый способ** – используется комплект для взятия образцов, содержащий одну/две цервикальные цитощетки и пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 0,5 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый одной цервикальной цитощеткой, и/или соскоб эпителия с поверхности шейки матки (экзоцервикс), взятый второй цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощеток обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

**Второй способ** – используется комплект для взятия образцов фирмы «Digene» (США), содержащий цервикальную цитощетку и пробирку с транспортной средой «Digene» в объеме 1,0 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой «Digene».

**Третий способ** – используется комплект для взятия образцов, содержащий комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/экзо-цервикса и пробирку на 5 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 2,0 мл.



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

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) и поверхности шейки матки (эктоцервикс), поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

**Четвертый способ** – используется комплект для взятия образцов, содержащий комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/экзо-цервикса и банку с транспортно-фиксирующей средой фирмы «CytoScreen» (Италия) или фирмы «PreservCyt» (США) для жидкостной цитологии.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) и поверхности шейки матки (экзоцервикс), поместить в пробирку с транспортно-фиксирующей средой. Рабочую часть зонда обломить и оставить в банке с транспортной средой.

**У мужчин**: соскоб эпителия уретры взятый универсальным зондом, поместить в пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта мужчин» в объеме 0,5 мл.

Условия хранения проб:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 5 сут;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 20 сут;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

В транспортно-фиксирующей среде для жидкостной цитологии материал хранится при комнатной температуре в течение года.

Для обработки взятого клинического материала используются следующие комплекты реагентов производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора:

- **«ДНК-сорб-АМ»** – для клинического материала, полученного первым, вторым и третьим способом. Так же для указанного материала допускается использование комплекта реагентов **«ДНК-сорб-В»** (ТУ 9398-003-01897593-2009);
- «**ДНК-сорб-С»** (ТУ 9398-075-01897593-2008) – для биоптатов слизистой;
- **«АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»** (ТУ 9398-233-01897593-2015) – для обработки образцов жидкостной цитологии.



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:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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[2], биологический материал, включая материалы, инструменты

[2] 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

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, 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[3]. 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.

[3] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.



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

- 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.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»).

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, включающих комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

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



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

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА**
**(с указанием фирм-производителей / поставщиков):**

**ЗОНА 1**

**Для выделения ДНК из проб требуются:**

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл (например, «Axygen», США).
8. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, фирмы «Axygen», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

**ЗОНА 2**

**Для проведения ПЦР-амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:**

1. Амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный);



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

для микропробирок 0,2 мл (например, «Palm-Cycler»,«Corbett Research», Австралия или «Maxygene», «Axygen», США).
2. Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4», «BioSan», Латвия; «Джин», «ДНК-Технология», Россия, или эквивалентный.
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые полипропиленовые микропробирки объемом 0,2 (0,5) мл (например «Axygen», США).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл (например, «Axygen», США).
8. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Axygen», США).
9. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
11. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
12. Емкость с дезинфицирующим раствором.

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА

### ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ

**(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).**

**Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.**

**Порядок работы**

1. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Добавление реагентов.

**Способ 1:**

- отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения).
- ресуспендировать **сорбент универсальный** до гомогенной консистенции, внести в каждую пробирку по **20 мкл**



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

**сорбента универсального** и по **300 мкл лизирующего раствора**, используя наконечники с аэрозольным барьером. Промаркировать пробирки.

**Способ 2:**

- перед началом работы во флакон с лизирующим раствором добавить весь объем (2 мл на 30 мл лизирующего раствора) предварительно гомогенизированного сорбента универсального и перемешать. Допускается хранение полученной смеси в течение 2 сут при комнатной температуре. Перед применением тщательно перемешать.
- отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения) и, используя наконечник с аэрозольным барьером, внести в каждую пробирку по **320 мкл** подготовленной смеси **лизирующего раствора** и **сорбента универсального**. Промаркировать пробирки.

3. В пробирки согласно маркировке внести по **100 мкл** пробы, используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**, используя наконечник с аэрозольным барьером.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и инкубировать **5 мин при температуре 65 °С** в термостате. После окончания инкубации перемешать на вортексе и поставить в штатив на **2 мин**.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин в течение 30 с**. Не захватывая сорбент универсальный, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без аэрозольного барьера.
6. Добавить в пробы по **1 мл отмывочного раствора,** перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального.
7. Повторить п. 5.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования



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

сорбента универсального. Поместить в термостат с температурой **65 °С на 5 мин**.

10. Перемешать на вортексе. Центрифугировать пробирки при **12 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (ДНК-проба). Указанный материал готов к постановке ПЦР.

**ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.**

Пробирки с ДНК-пробами переносят в зону ПЦР-амплификации.

## <u>ЭТАП 2.</u> ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

**(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации)**

**Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.**

**В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы, которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.**

### <u>Проведение амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант скрин-FEP 2х</u>

**В комплекте реагентов используются две смеси праймеров и зондов:**

- **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1** - для амплификации и детекции ДНК ВПЧ 16, 31, 35, 39 и 59 генотипов. Детекция 31, 35, 39 и 59 генотипов осуществляется по каналу FAM (канал «Специфика» в детекторе «Джин» или канал 1 в детекторе «АЛА-1/4»), детекция 16 генотипа осуществляется отдельно по каналу HEX/JOE (канал «ВК» в детекторе «Джин» или канал 2 в детекторе «АЛА-1/4»). *(Данная смесь не содержит внутреннего контроля).*
- **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-2** - для амплификации и детекции ДНК ВПЧ 18, 33, 45, 52, 58 и 67 генотипов, а так же участка b-глобинового гена человека (эндогенный внутренний контроль). Детекция 18, 33, 45, 52, 58 и 67 генотипов осуществляется по каналу FAM (Канал «Специфика» в детекторе «Джин» или канал 1 в детекторе «АЛА-1/4»),



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

детекция сигнала внутреннего контроля осуществляется отдельно по каналу HEX/JOE (канал «ВК» в детекторе «Джин» или канал 2 в детекторе «АЛА-1/4»).

Для проведения анализа осуществляется амплификация ДНК с ПЦР-смесями-1-FEP ВПЧ-1 и ВПЧ-2. Результат считается положительным, если положительный сигнал регистрируется хотя бы с одной из ПЦР-смесей-1-FEP.

## A. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-буфера-Flu** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (28 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-буфером-Flu (420 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

   **ВНИМАНИЕ!** Приготовленная смесь рассчитана на проведение **56** реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.
2. Подготовить реакционные смеси (см. табл. 1). При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается двумя контрольными точками для каждой смеси **(отрицательным и положительным контролями)**. Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.
3. Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
   - **7 мкл ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1 или ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2;**
   - **8 мкл смеси ПЦР-буфера-Flu и полимеразы (TaqF).**



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

**Таблица 1**

**Схема приготовления реакционных смесей**

| **Необходимо исследовать образцов:** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** | **13** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1/ ВПЧ-2, мкл** | 28 | 35 | 42 | 49 | 56 | 63 | 70 | 77 | 84 | 91 | 98 | 105 | 112 |
| **Смесь ПЦР-буфера-Flu и полимеразы (TaqF), мкл** | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 | 80 | 88 | 96 | 104 | 112 | 120 | 128 |
| **Необходимо исследовать образцов:** | **14** | **15** | **16** | **17** | **18** | **19** | **20** | **21** | **22** | **23** | **24** | **25** | **26** |
| **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1/ ВПЧ-2, мкл** | 119 | 126 | 133 | 140 | 147 | 154 | 161 | 168 | 175 | 182 | 189 | 196 | 203 |
| **Смесь ПЦР-буфера-Flu и полимеразы (TaqF), мкл** | 136 | 144 | 152 | 160 | 168 | 176 | 184 | 192 | 200 | 208 | 216 | 224 | 232 |

**ВНИМАНИЕ!** Использование данных таблицы идентично как в случае расчета для ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1, так и в случае расчета для ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2.

4. Установить на штатив «Рабочее место» по **две** ПЦР-пробирки для каждого исследуемого образца, положительного и отрицательного контролей. Внести в половину пробирок по **15 мкл** приготовленной смеси, содержащей **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1**. Во вторую половину пробирок внести по **15 мкл** приготовленной смеси, содержащей **ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-2**.
5. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР[4].
6. Приготовить образцы **«Фон». Необходимо готовить по 2 фоновых образца на каждую ПЦР-смесь-1**. Для этого:
   - **Если используется один из рекомендованных комплектов для выделения ДНК:**
     в две ПЦР-пробирки внести по **7 мкл ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1** и по **18 мкл ПЦР-смеси-Фон ВПЧ**. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР[4].
   - **Если используется иной метод выделения ДНК:**

[4] При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой, минеральное масло можно не добавлять.



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

в две ПЦР-пробирки внести по **7 мкл ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1,** по **8 мкл ПЦР-буфера-Flu** и по **10 мкл отрицательного контроля выделения**. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР[4].

**Аналогично готовить пробирки «Фон» для ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2.**

**ВНИМАНИЕ!** После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.

**Б. Проведение ПЦР-амплификации:**

1. В готовые пары пробирок внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
   **а) отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пару пробирок по **10 мкл ТЕ-буфера**.
   **б) положительный контроль (К+)** – внести в пару пробирок по **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 16, 31, 33 типов и ДНК человека**.
3. Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 2). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (2-3 с).



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

**Таблица 2**

## Программа амплификации ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 типов

| | Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): | | | | | | | | | Другие приборы | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **«Терцик» («ДНК-Технология»)** | | | **«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»)** | | | **«Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»)** | | | | | |
| цикл | темпе-ратура | время | циклы | темпе-ратура | время | циклы | темпе-ратура | время | циклы | темпе-ратура | время | циклы |
| 1 | **95 °C** | 15 мин | 1 | **95 °C** | 15 мин | 1 | **95 °C** | 15 мин | 1 | **95 °C** | 15 мин | 1 |
| 2 | **93 °C** | 5 с | 20 | **95 °C** | 10 с | 50 | **93 °C** | 5 с | 50 | **95 °C** | 25 с | 50 |
| | **59 °C** | 5 с | | **59 °C** | 20 с | | **59 °C** | 10 с | | **59 °C** | 25 с | |
| | **72 °C** | 5 с | | **72 °C** | 10 с | | **72 °C** | 5 с | | **72 °C** | 25 с | |
| 3 | **93 °C** | 2 с | 30 | **72 °C** | 1 мин | 1 | **72 °C** | 1 мин | 1 | **72 °C** | 1 мин | 1 |
| | **59 °C** | 10 с | | **95 °C** | 20 с | 1 | **95 °C** | 20 с | 1 | **95 °C** | 20 с | 1 |
| 4 | **10 °C** | хранение | | **10 °C** | хранение | | **10 °C** | хранение | | **10 °C** | хранение | |

4. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции с помощью прибора «АЛА-1/4» или «Джин».

## В 1. Детекция результатов с помощью прибора «Джин»

Детекция результатов может быть проведена в течение 1 нед после проведения амплификации при хранении образцов при температуре от 2 до 20 °С.

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором «Джин» проводится согласно «Паспорту ПЦР-детектора флуоресцентного «Джин».

Для проведения детекции и учета результатов необходимо в программе «Gene» создать 2 новых теста: **«HPV-1» и «HPV-2».** Параметры новых тестов (см. табл. 3):

**Таблица 3**

### Параметры новых тестов

| Тест | «-» | «+» | ВК |
|---|---|---|---|
| **«HPV-1»** | 1,75 | 2,1 | **2,1** |
| **«HPV-2»** | 1,75 | 2,1 | 2,5 |

Примечание. Задать новые тесты можно выбрав «Настройки», «Список тестов» в меню программы. При выходе из программы необходимо сохранить изменения.

1. Включить прибор и запустить программу «Gene» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Ввести количество измеряемых



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

образцов (включая две фоновые пробирки), выбрать вид теста **«HPV-1»** в списке тестов в графе «Тест». В следующей строке вновь задать количество образцов (включая 2 фоновые пробирки), выбрать вид теста **«HPV-2»,** нажать «ОК».

3. Ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»), анализируемых на ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1. Далее переключиться с теста «HPV-1» на «HPV-2» (в левом верхнем углу программы в выпадающем списке выбрать «HPV-2») и аналогично ввести последовательность образцов, анализируемых по смеси на ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2.
4. В качестве образцов, обозначенных «ФОН» использовать образцы «**Фон**» соответствующей смеси. **После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно.** Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.
5. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «Джин» в соответствии с заданной последовательностью (группами по 12 образцов). Сначала в прибор устанавливаются все пробирки, содержащие ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1, затем все пробирки, содержащие ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-2. Запустить измерение с помощью значка цветной призмы в панели активных кнопок (вверху экрана). По окончании измерения вынуть пробирки и нажать кнопку «ОК».
6. Интерпретация результатов несколько отличается от предложенного в программе Gene автоматического варианта, что связано с использованием для проведения анализа двух ПЦР-смесей-1.

**Автоматическая интерпретация результатов (для прибора «Джин»)**

Для осуществления автоматической интерпретации результатов используется прилагаемое к комплекту программное обеспечение в формате Microsoft® Excel.

Требования к обозначению образцов для осуществления правильной автоматической интерпретации результатов:

1. Название теста в программе Gene для образцов,



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

анализируемых по смеси ВПЧ-1 должно быть строго **HPV-1,** анализируемых по смеси ВПЧ-2 должно быть **HPV-2.**

2. Одинаковые образцы, анализируемые по смесям ВПЧ-1 и ВПЧ-2 должны иметь *одинаковое обозначение* в программе Gene. **Или:** в программе Gene должны быть обозначены только образцы, анализируемые по смеси ВПЧ-1, а образцы, анализируемые по смеси ВПЧ-2 не должны содержать никаких обозначений и быть установленными в том же порядке, что и образцы, анализируемые по смеси ВПЧ-1.
3. Отрицательные контроли выделения и ПЦР должны быть обозначены как «ОК», «В-», «–» или «k-».
4. Положительные контроли должны быть обозначены как «+» или «k+».

**Порядок действий:**

– После проведения раунда детекции в приборе «Джин» необходимо сохранить результаты в формате программы Gene. Для этого войдите в меню «Протокол» и далее выберите пункт «Сохранить». В открывшемся окне выберите папку, введите имя файла и нажмите «Сохранить».
– Откройте прилагающийся к набору реагентов файл Microsoft® Excel «AmpliSens FEP HR HPV Screen Results Matrix.xls», согласитесь на включение макроса

Примечание: Если при открытии документа Excel не активируется макрос (выдается соответствующее сообщение, кнопка «Результаты» неактивна) необходимо изменить уровень безопасности Microsoft® Excel. Для этого выберите в меню пункт «Сервис»>«Макрос»>«Безопасность…» и установите средний уровень безопасности.

– Нажмите кнопку «Открыть…», перейдите в папку, в которую было произведено сохранение, и откройте файл протокола. Нажмите «Результаты».

## В 2. Детекция результатов с помощью прибора «АЛА-1/4»

Детекция результатов может быть проведена в течение 1 нед после проведения амплификации при хранении образцов при температуре от 2 до 20 °С.

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором «АЛА-1/4» проводится согласно паспорту к прибору.

Для проведения детекции и учета результатов необходимо в программе «ALA_1» создать 2 новых теста: **«HPV-1» и «HPV-2».** Параметры новых тестов (см. табл. 4):



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

**Таблица 4**

**Параметры новых тестов**

| Тест | Каналы | ВКО | Настройки для FAM | | | | Настройки для HEX | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | «п-» | «п+» | ВКО/фон | Инфекция | «п-» | «п+» | Инфекция | ВКО/Фон |
| **«HPV1»** | FAM,HEX | *нет* | 2,0 | 2,3 | **–** | ВПЧ<br>ВКР | 2,0 | 2,3 | ВПЧ 16 | **–** |
| **«HPV2»** | FAM,HEX | HEX | 2,0 | 2,3 | – | ВПЧ<br>ВКР | 2,0 | 2,3 | – | 3,0 |

Примечание. Уровень фона и доверительный интервал не задаются.

Задать новые тесты можно выбрав «Настройки», «Тест-система» в меню программы. При закрытии окна необходимо сохранить изменения кнопкой «Сохранить».

Создание привязки инфекций к каналам:

- необходимо задать названия инфекций (ВПЧ 16 и ВПЧ ВКР). Для этого используется поле «Привязка каналов», в нижней части которого вводятся названия и добавляются в список кнопкой «Добавить».
- необходимо выбрать появившееся в списке название инфекции и щелкнуть на кнопке (правее списка), соответствующей имени канала.

1. Включить прибор и запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Создать протокол измерения. Ввести название протокола, выбрать вид теста **«HPV1»** в списке тестов, задать соответствующий тип ротора. Ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»), анализируемых на ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1, включая образцы «фон» (задаются клавишами Ctrl+F)
3. Выбрать вид теста **«HPV2»** в списке тестов. Продолжая список, в том же порядке ввести последовательность детектируемых образцов, анализируемых на ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2, включая образцы «фон».

В качестве образцов, обозначенных «ФОН» использовать образцы «**Фон**» соответствующей смеси. **После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно.** Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.



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

4. Выйти из окна редактирования протокола (кнопка «Exit»).
5. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «АЛА-1/4» в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение с помощью значка пробирки в панели активных кнопок (вверху экрана). Сообщения о превышении фонового сигнала на X % игнорируются.
6. Интерпретация результатов должна учитывать, что для проведения анализа используются две ПЦР-смеси-1.

**Интерпретация результатов (для прибора «АЛА-1/4» и «Джин»)**

**Интерпретация результатов исследования со смесью «ВПЧ-1» (тест HPV1)**

Данная смесь позволяет выявлять часть генотипов ВПЧ ВКР (канал FAM) и отдельно определяет ВПЧ 16 генотипа (канал HEX). Соответственно, при положительном сигнале по каналу FAM – результат «Обнаружен ВПЧ ВКР», HEX – «Обнаружен ВПЧ 16 генотипа».

Особенностью данной смеси является отсутствие ВКО. Поэтому при отрицательном результате по обоим каналам общий результат теста (отрицательный или невалидный) будет определяться результатом по смеси «ВПЧ-2».

**Интерпретация результатов исследования со смесью «ВПЧ-2» (тест HPV2)**

Данная смесь позволяет выявлять другую часть генотипов ВПЧ ВКР (канал FAM) и внутренний контроль (канал HEX). Соответственно, при положительном сигнале по каналу FAM – результат «Обнаружен ВПЧ ВКР».

При отрицательном сигнале по каналу FAM и положительном по каналу HEX – результат «ВПЧ ВКР не обнаружен». При отрицательном сигнале по каналу FAM и по каналу HEX – результат «Невалидный». Следует, однако, учитывать, что даже при невалидном результате исследования по смеси «ВПЧ-2» общий результат исследования может быть положительным в случае, если выявляется ВПЧ ВКР или ВПЧ 16 типа по смеси «ВПЧ-1» (см. табл. 5).



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

**Таблица 5**

## Общая интерпретация результатов исследования

| Смесь «ВПЧ-1» (HPV1) | | Смесь «ВПЧ-2» (HPV2) | | Результат |
|---|---|---|---|---|
| Fam (ВПЧ ВКР) | Hex (ВПЧ 16) | Fam (ВПЧ ВКР) | Hex (ВК) | |
| - | - | - | + | **ВПЧ ВКР не обнаружен** |
| +<br>- | - | -<br>+ | + | **Обнаружен ВПЧ ВКР** |
| - | + | - | + | **Обнаружен ВПЧ 16 типа** |
| +<br>-<br>+ | + | -<br>+<br>+ | + | **Обнаружен ВПЧ ВКР, в том числе 16 типа** |
| - | - | - | - | **Результат невалидный** |
| +<br>- | - | -<br>+ | - | **Обнаружен ВПЧ ВКР** |
| - | + | - | - | **Обнаружен ВПЧ 16 типа** |
| +<br>-<br>+ | + | -<br>+<br>+ | - | **Обнаружен ВПЧ ВКР, в том числе 16 типа** |

**Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 6).**

**Таблица 6**

## Учет результатов

| Контроли | Контролируемый этап ПЦР-анализа | Результат реакции с ПЦР-смесью-1-FEP ВПЧ-1 | Результат реакции с ПЦР-смесью-1-FEP ВПЧ-2 |
|---|---|---|---|
| В– | Выделение ДНК | Канал «FAM» *отрицат.*<br>Канал «HEX» *отрицат.* | Канал «FAM» *отрицат.*<br>Канал «HEX» *отрицат.* |
| К– | ПЦР | Канал «FAM» *отрицат.*<br>Канал «HEX» *отрицат.* | Канал «FAM» *отрицат.*<br>Канал «HEX» *отрицат.* |
| К+ | ПЦР | Канал «FAM» *положит.*<br>Канал «HEX» *положит.* | Канал «FAM» *положит.*<br>Канал «HEX» *положит.* |

## Проведение амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант скрин-FEP 3х

**В комплекте реагентов используются одна смесь праймеров и зондов.** Детекция 31, 35, 39 и 59 генотипов осуществляется по каналу ROX (канал 3 в детекторе «АЛА-1/4»), детекция 16, 18, 33, 45, 52, 58 и 67 генотипов осуществляется по каналу FAM (канал 1 в детекторе «АЛА-1/4»), детекция сигнала внутреннего контроля осуществляется отдельно по каналу HEX (канал 2 в детекторе «АЛА-1/4»).

### А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-буфера-Flu** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной



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

пробирки с **полимеразой (TaqF) (28 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-буфером-Flu (420 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

**ВНИМАНИЕ!** Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

2. Смешать в отдельной пробирке из расчета на одну реакцию:
   - **7 мкл ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ 3х;**
   - **8 мкл смеси ПЦР-буфера-Flu и полимеразы (TaqF).**

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается двумя контрольными точками **(отрицательным и положительным контролями)**. Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. Установить на штатив «Рабочее место» по одной ПЦР-пробирке для каждого исследуемого образца, положительного и отрицательного контролей. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной смеси.
4. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР[4].
5. Приготовить контрольные образцы **«Фон». Необходимо готовить не менее 2 фоновых образцов**. Для этого:
   - **Если используется один из рекомендованных комплектов для выделения ДНК:**
     в две ПЦР-пробирки внести по **7 мкл ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ 3х** и по **18 мкл ПЦР-смеси-Фон ВПЧ**. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР[4].
   - **Если используется иной метод выделения ДНК:**
     в две ПЦР-пробирки внести по **7 мкл ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ 3х,** по **8 мкл ПЦР-буфера-Flu** и по **10 мкл отрицательного контроля выделения**. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР[4].

**ВНИМАНИЕ!** После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.

### Б. Проведение ПЦР-амплификации

1. В готовые пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных



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

из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.

2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
   **а) отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мклТЕ-буфера**.
   **б) положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 16, 31, 33 типов и ДНК человека**.
3. Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 7). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (2-3 с).

**Таблица 7**

**Программа амплификации ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 типов**

| | Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): | | | | | | | | | **Другие приборы** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **«Терцик» («ДНК-Технология»)** | | | **«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»)** | | | **«Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «Maxygene» («Axygen»)** | | | | | |
| цикл | темпе-ратура | время | циклы | темпе-ратура | время | циклы | темпе-ратура | время | циклы | темпе-ратура | время | циклы |
| 1 | **95 °С** | 15 мин | 1 | **95 °С** | 15 мин | 1 | **95 °С** | 15 мин | 1 | **95 °С** | 15 мин | 1 |
| 2 | **93 °С** | 5 с | 20 | **95 °С** | 10 с | 50 | **93 °С** | 5 с | 50 | **95 °С** | 25 с | 50 |
| | **59 °С** | 5 с | | **59 °С** | 20 с | | **59 °С** | 10 с | | **59 °С** | 25 с | |
| | **72 °С** | 5 с | | **72 °С** | 10 с | | **72 °С** | 5 с | | **72 °С** | 25 с | |
| 3 | **93 °С** | 2 с | 30 | **72 °С** | 1 мин | 1 | **72 °С** | 1 мин | 1 | **72 °С** | 1 мин | 1 |
| | **59 °С** | 10 с | | **95 °С** | 20 с | 1 | **95 °С** | 20 с | 1 | **95 °С** | 20 с | 1 |
| 4 | **10 °С** | хранение | | **10 °С** | хранение | | **10 °С** | хранение | | **10 °С** | хранение | |

4. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции с помощью прибора «АЛА-1/4».

## В. Детекция результатов с помощью прибора «АЛА-1/4»

Детекция результатов может быть проведена в течение 1 нед после проведения амплификации при хранении образцов при температуре от 2 до 20 °С.

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором «АЛА-1/4» проводится согласно паспорту к прибору.

Для проведения детекции и учета результатов необходимо в программе «ALA_1» создать новый тест: **«HPV».** Параметры теста (см. табл. 8):



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

**Таблица 8**

**Параметры нового теста**

| Канал 1 «FAM» | | | Канал 2 «HEX» | | | Канал 3 «ROX» | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| «п-» | «п+» | Инфекция | «п-» | «п+» | ВКО/фон | «п-» | «п+» | Инфекция |
| 2,0 | 2,3 | *ВПЧ ВКР* | - | - | 3,0 | 2,0 | 2,3 | *ВПЧ ВКР* |

Примечание. Уровень фона и доверительный интервал не задаются.

Задать новый тест можно выбрав «Настройки», «Тест-система» в меню программы. Перед закрытием окна необходимо сохранить изменения кнопкой «Сохранить».

Создание привязки инфекций к каналам:

- необходимо задать название инфекции (ВПЧ ВКР). Для этого используется поле «Привязка каналов», в нижней части которого вводятся названия и добавляются в список кнопкой «Добавить».
- необходимо выбрать появившееся в списке название инфекции и щелкнуть на кнопке (правее списка), соответствующей имени канала.

1. Включить прибор и запустить программу «ALA_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Создать протокол измерения. Ввести название протокола, выбрать вид теста **«HPV»** в списке тестов, задать соответствующий тип ротора. Ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»), включая образцы «фон» (задаются клавишами Ctrl+F)
3. В качестве образцов, обозначенных «ФОН» использовать образцы «**Фон**». **После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно.** Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.
4. Выйти из окна редактирования протокола (кнопка «Exit»).
5. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «АЛА-1/4» в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение с помощью значка пробирки в панели активных кнопок (вверху экрана). Сообщения о превышении фонового сигнала на X % игнорируются.



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

**Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 9).**

**Таблица 9**

## Учет результатов

| Контроли | Контролируемый этап ПЦР-анализа | Результат реакции |
|---|---|---|
| В- | Выделение ДНК | Канал «Fam» *отрицат*.<br>Канал «Hex» *отрицат.*<br>Канал «Rox» *отрицат.* |
| К- | ПЦР | Канал «Fam» *отрицат*.<br>Канал «Hex» *отрицат.*<br>Канал «Rox» *отрицат.* |
| К+ | ПЦР | Канал «Fam» *положит*.<br>Канал «Hex» *положит*.<br>Канал «Rox» *положит*. |



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

## СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

**Срок годности.** 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» (кроме полимеразы (TaqF), ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1, ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2 и ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ 3х) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF), ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-1, ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ-2 и ПЦР-смесь-1-FEP ВПЧ 3х хранить при температуре не выше минус 16 °С. Следует избегать длительного нахождения ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-1, ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ-2, ПЦР-смеси-1-FEP ВПЧ 3х на свету.



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

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель 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.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество комплекта реагентов **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL»** направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru[5].

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 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»
Управления делами Президента
Российской Федерации — Е.В. Ржевская

[5] 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 |  | Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению |



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