

«УТВЕРЖДАЮ»

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



А.В. Горелов

2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК вирусов
папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в
клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной
детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ФОРМАТ FEP	14
СОСТАВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	16
А. Подготовка пробирок для амплификации	16
Б. Проведение амплификации.....	20
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	22
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	22
ФОРМАТ FRT	26
СОСТАВ	26
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	28
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	28
А. Подготовка пробирок для амплификации	28
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	32
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	33
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	37
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	38
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец (участок β-глобинового гена человека)
ВПЧ	- вирус папилломы человека
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
В-	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ТСМ	- транспортная среда с муколитиком
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
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL»** предназначен для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, полученных методом соскоба.

Набор реагентов рекомендуется рассматривать как **вторичный** при диагностике папилломавирусной инфекции, позволяющий дифференцировать два наиболее онкогенных генотипа вируса. На первом этапе диагностики рекомендуется использовать набор реагентов **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EPh»** (с электрофоретической детекцией), **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL 2х»**, **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL 3х»** или **«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL»** (с гибридационно-флуоресцентной детекцией) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, выявляющие широкий спектр (11–14 генотипов) высокоонкогенных генотипов ВПЧ.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в

комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК ВПЧ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Метод основан на одновременной амплификации участков ДНК ВПЧ и участка ДНК β-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-исследование на наличие ДНК ВПЧ 16 и 18 генотипов проводится в одной пробирке. 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 ($10^5 - 10^7$ клеток/мл). Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение амплификации), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. В случаях, если соскоб эпителия взят неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток), сигнал амплификации β-глобинового гена будет заниженным.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 4 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.

Форма 5 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 6 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК ВПЧ 16, 18 генотипов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «по конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4, 5 и 6 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию из клинического материала ДНК и амплификацию ДНК ВПЧ 16, 18 генотипов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «по конечной точке».

Формат FRT

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

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

ВНИМАНИЕ! Формы выпуска набора реагентов 1-4 в формате FRT можно использовать как **для качественного выявления**, так и для **количественного определения** ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 генотипов.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК ВПЧ 16, 18 генотипов с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию из клинического материала ДНК и амплификацию ДНК ВПЧ 16, 18 генотипов с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²
Соскоб цервикального эпителия	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект»	1x10 ³

Линейный диапазон измерения набора реагентов для каждой мишени составляет от 10³ до 10⁸ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК ВПЧ 16 и 18 генотипов. Аналитическая специфичность набора была исследована посредством добавления в реакцию ДНК/РНК различных микроорганизмов (аденовирус типы 2, 3 и 7, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус ветряной оспы, вирус гепатита В, С, вирус иммунодефицита человека первого типа, вирус герпеса человека типы 6 и 8, вирус простого герпеса, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, ДНК вирусов папилломы человека рода β, γ, μ (1, 3, 4, 5, 8, 37, 38, 65, 20, 24, 49, 50, 15), рода α низкого и неустановленного риска (6, 11, 26,

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду

53, 7, 27, 10), рода α высокого канцерогенного риска (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68) в концентрации 10^8 копий ДНК ВПЧ на мл). Перекрестных реакций при этом не наблюдалось.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического 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 Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с 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 фильтром⁴. 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 клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁴ Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- (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.
 - 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 реагентов безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей 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):

- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1-3 (формат FEP) и 1, 2 (формат FRT).
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема.
7. Одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл в штативах.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.

При работе с форматом FEP:

13. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 мл или 0,5 мл – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.
14. Программируемый амплификатор для пробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия); для пробирок 0,2 мл (например, Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия) или МахуGene (Ахуген, США).
15. Флуоресцентный ПЦР-детектор с тремя и более каналами детекции (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия); «Джин» («ДНК-Технология», Россия)).

При работе с форматом FRT:

16. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Мх3000Р (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1мл – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики»,

разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для проведения анализа используется следующий клинический материал:

У женщин: образцы эпителия берут 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 с муколитиком (ТСМ)» 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 из эндоцервикса, 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-/экзоцервикса и пробирку на 5 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)» в объеме 2,0 мл.

Соскоб из эндоцервикса и экзоцервикса 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-/экзоцервикса и банку с транспортно-фиксирующей средой фирмы CytoScreen (Италия) или фирмы PreservCyt (США) для жидкостной цитологии.

Соскоб из эндоцервикса и экзоцервикса поместить в пробирку с транспортно-фиксирующей средой. Рабочую часть

зонда обломить и оставить в банке с транспортной средой.

Пятый способ – используется «Комплект для самостоятельного взятия мазка из влагалища для диагностики инфекций методом ПЦР» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

У мужчин: соскоб эпителия уретры, взятый универсальным зондом, поместить в пробирку на 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)» 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.

ФОРМАТ FEP**СОСТАВ**

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
TE-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделения ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 4, 5 и 6.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон-red	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО ДНК ВПЧ 16, 18 типов и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

⁵ При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО ДНК ВПЧ 16, 18 типов и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

При использовании форм выпуска набора 4, 5 и 6 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Порядок работы см. в **приложении «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ»»**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А1. Подготовка пробирок для амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FEP

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Приготовить образцы «Фон». Необходимо готовить 2 фоновых образца:

- При использовании одного из рекомендованных комплектов реагентов для экстракции ДНК: в две пробирки на поверхность воска внести 20 мкл ПЦР-смеси-

Фон-red. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР (масло рекомендуется добавлять вне зависимости от типа амплификатора).

- При использовании других наборов реагентов для экстракции ДНК необходимо следовать инструкции к используемому набору.

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.

2. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL ВПЧ 16/18** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL ВПЧ 16/18**.
4. На поверхность добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (масло рекомендуется добавлять вне зависимости от типа амплификатора).
5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 16, 18 типов и ДНК человека**;
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО, в случае использования одного из рекомендованных комплектов реагентов для экстракции ДНК.

Примечание – При использовании других наборов реагентов для экстракции ДНК в пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести 10 мкл соответствующей пробы (В–), выделенной согласно инструкции к используемому набору.

A1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F
Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Приготовить образцы «Фон». Необходимо готовить 2 фоновых образца. Для этого:
 - При использовании одного из рекомендованных комплектов реагентов для экстракции ДНК: в две ПЦР-пробирки внести 10 мкл ПЦР-смеси-1-FL ВПЧ 16/18 и 15 мкл ПЦР-смеси-Фон. На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР (масло рекомендуется добавлять вне зависимости от типа амплификатора).
 - При использовании других наборов реагентов для экстракции ДНК необходимо следовать инструкции к используемому набору.

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.

2. Подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Для этого содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (30 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

3. Подготовить реакционную смесь (см. табл. 1). При расчете следует учитывать, что исследование даже одного образца сопровождается постановкой трех контрольных реакций. Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом и рассчитывать на одну реакцию больше.

Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР требуется:

- 10 мкл **ПЦР-смеси-1-FL ВПЧ 16/18**;
- 5 мкл **смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**.

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей

Число исследуемых образцов	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18, мкл	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Число исследуемых образцов	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18, мкл	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175

Примечание – Расчет приведен для образцов в соответствие с формулой: $n + 4$, где n – количество исследуемых клинических образцов, 4 – контроли ПЦР-исследования, из которых 1 контроль этапа экстракции, 2 контроля этапа ПЦР, и запас на одну пробирку.

4. Установить в штатив «Рабочее место» по одной ПЦР-пробирке для каждого исследуемого образца, положительного и отрицательных контролей. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной смеси.
5. На поверхность добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (масло рекомендуется добавлять вне зависимости от типа амплификатора).
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку

10 мкл ДНК-буфера.

- б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 16, 18 типов и ДНК человека.**
- в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО, в случае использования одного из рекомендованных комплектов реагентов для экстракции ДНК.

Примечание – При использовании других наборов реагентов для экстракции ДНК в пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести 10 мкл соответствующей пробы (В–), выделенной согласно инструкции к используемому набору.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу (см. табл. 2, 3). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1-FEP»

Цикл	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cyclcr, MaxyGene		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	10	хранение		10	хранение		10	хранение	

Примечание – Данная программа используется при работе **только с «ПЦР-комплектom» вариант FEP.**

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс-1-FEP-F»

Цикл	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cycler, MxyGene		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	10	хранение		10	хранение		10	хранение	

Примечание – Данная программа используется при работе только с «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.

ВНИМАНИЕ! Если данный комплект реагентов используется совместно с набором реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL 2х» или «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL 3х», то возможно использование единой программы амплификации (см. табл. 4)

Таблица 4

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

Цикл	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cycler; MxyGene		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	93	5 с	20	95	10 с	50	93	5 с	50
	59	5 с		59	20 с		59	10 с	
	72	5 с		72	10 с		72	5 с	
3	93	2 с	30	72	1 мин	1	72	1 мин	1
	59	10 с		95	20 с	1	95	20 с	1
4	10	хранение		10	хранение		10	хранение	

2. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции с помощью прибора для детекции флуоресцентного сигнала.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к соответствующему прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ 16 генотипа,
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ 18 генотипа,
- по каналу ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

Учет результатов теста

Канал	FAM	HEX	ROX
Результат	ВПЧ 16	ВПЧ 18	ВКО

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к «ПЦР-комплекту», а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип

интерпретации результатов следующий (см. табл. 5):

- значения ниже установленного порогового значения отрицательного результата принимаются **отрицательными**, выше установленного порогового значения положительного результата – **положительными**, между порогами – **сомнительными**;
- положительный результат по каналу FAM свидетельствует о наличии в пробе **ДНК ВПЧ 16 генотипа**;
- положительный результат по каналу HEX свидетельствует о наличии в пробе **ДНК ВПЧ 18 генотипа**;
- результат исследования **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу ROX ниже установленного порогового значения.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 5

Общая интерпретация результатов исследования

FAM (ВПЧ 16)	HEX (ВПЧ 18)	ROX (ВКО)	Результат
–	–	+	ВПЧ 16, 18 генотипов не обнаружен
+	–	+	Обнаружен ВПЧ 16 генотипа
+	–	–	
–	+	+	Обнаружен ВПЧ 18 генотипа
–	+	–	
+	+	+	Обнаружен ВПЧ 16,18 генотипов
+	+	–	
–	–	–	Результат невалидный

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 6.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируе-мый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу			Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	HEX	ROX	
B-	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	«-» или «ОК»
K-	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	«нд»
K+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

1. При получении **сомнительного результата** необходимо повторить амплификацию и детекцию соответствующих образцов.
2. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналам FAM и/или HEX ниже порогового значения положительного результата, то необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК ВПЧ.
3. При получении **невалидного результата** необходимо повторить ПЦР-исследование для соответствующих образцов, начиная с этапа экстракции. В случае получения воспроизводимого невалидного значения результат считается невалидным.
4. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B-) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по любому из каналов выше порогового значения положительного результата, то это свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа

ФОРМАТ FEP

по всем образцам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁶	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
TE-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации, дифференциации и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К1 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К2 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К3 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа

⁶ При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

- программное обеспечение в формате Microsoft® Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix для автоматического расчета концентрации ДНК ВПЧ 16 и 18 генотипов и интерпретации результатов.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации, дифференциации и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
К1 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К2 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
К3 ВПЧ 16, 18	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

- программное обеспечение в формате Microsoft® Excel AmpliSens HPV 16-18 Results Matrix для автоматического расчета концентрации ДНК ВПЧ 16 и 18 генотипов и интерпретации результатов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 генотипов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

При использовании форм выпуска набора 3 и 4 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Порядок работы см. в **приложении «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ»»**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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.

A1. Подготовка пробирок для амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL ВПЧ 16/18** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL ВПЧ 16/18**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции:

для проведения качественного анализа:

- а) **отрицательный контроль (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
- б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл К2 ВПЧ 16, 18**;
- в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО.

для проведения количественного анализа:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
- б) **калибраторы ВПЧ (К1, К2, К3)** – в три пробирки внести по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора (**К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18**).
- в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО.

A2. Подготовка пробирок для амплификации при помощи «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

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

1. Подготовить смесь **ПЦР-смеси-2-FRT** и полимеразы

(TaqF). Для этого содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (30 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

2. Подготовить реакционную смесь (см. табл. 7 и 8). При расчете следует учитывать, что исследование даже одного образца сопровождается постановкой **в качественном формате трех** контрольных точек, **в количественном формате – пяти** контрольных точек. Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом и рассчитывать на одну реакцию больше.

Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР требуется:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FL ВПЧ 16/18;
- 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).

Таблица 7

**Схема приготовления реакционных смесей для
качественного определения**

Число исследуемых образцов	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18, мкл	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210
Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105
Число исследуемых образцов	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18, мкл	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175

Примечание – Расчет приведен для образцов в соответствие с формулой: $n + 4$, где n – количество исследуемых клинических образцов, 4 – контроли ПЦР-исследования, из которых 1 контроль этапа экстракции, 2 контроля этапа ПЦР и запас на одну пробирку.

Таблица 8

**Схема приготовления реакционных смесей для
количественного определения**

Число исследуемых образцов	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18, мкл	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115
Число исследуемых образцов	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18, мкл	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370
Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF), мкл	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185

Примечание – Расчет приведен для образцов в соответствие с формулой: $n + 6$, где n – количество исследуемых клинических образцов, 6 – контроли ПЦР-исследования, из которых 1 контроль этапа экстракции, 4 контроля этапа ПЦР и запас на одну пробирку.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых образцов и контролей. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной смеси.
4. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
5. Поставить контрольные реакции:
для проведения качественного анализа:
 - а) **отрицательный контроль (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;

- б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл К2 ВПЧ 16, 18**;
- в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

для проведения количественного анализа:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
- б) **калибраторы ВПЧ (К1, К2, К3)** – в три пробирки внести по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора (**К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18**).
- в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала **«АмплиСенс-1»** (см. табл. 9).

Таблица 9

Программа амплификации «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ⁷			Приборы планшетного типа ⁸		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во 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 и ROX (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

⁷ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные.

⁸ Например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3005P, «ДТ-96» или аналогичные.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК ВПЧ 16 генотипа**,
- по каналу для флуорофора JOE (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК ВПЧ 18 генотипа**,
- по каналу для флуорофора ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК человека, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции **S-образной формы** с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

При проведении качественного определения (см. табл. 10):

- **ДНК ВПЧ 16 генотипа обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла C_t , не

- превышающее указанное граничное значение;
- **ДНК ВПЧ 18 генотипа обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение;
- **ДНК ВПЧ 16 генотипа и 18 генотипа не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофоров FAM и JOE значение порогового цикла *Ct* не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное граничное значение;
- результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора **ROX** значение порогового цикла *Ct* отсутствует или превышает указанное граничное значение.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 10

Общая интерпретация результатов исследования

FAM (ВПЧ 16)	JOE (ВПЧ 18)	ROX (ВКО)	Результат
–	–	+	ВПЧ 16, 18 генотипов не обнаружен
+	–	+	Обнаружен ВПЧ 16 генотипа
+	–	–	
–	+	+	Обнаружен ВПЧ 18 генотипа
–	+	–	
+	+	+	Обнаружен ВПЧ 16,18 генотипов
+	+	–	
–	–	–	Результат невалидный

При проведении количественного определения:

На основании значений порогового цикла *Ct* и, исходя из заданных значений калибраторов ВПЧ 16, 18 и ДНК человека, происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК ВПЧ 16 генотипа, ДНК ВПЧ 18 генотипа и ДНК человека в ПЦР-пробе. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ 16 и/или 18 генотипов, приходящегося на 100 тыс клеток человека:

ФОРМАТ FRT

$$I_g = \left[\frac{\text{число копий ДНК ВПЧ (16 или 18)}}{\text{число копий ДНК человека}} \times 200000 \right] = I_g(\text{ВПЧ на } 100 \text{ тыс. клеток})$$

Полученный результат интерпретируется в соответствии с табл. 11:

Таблица 11

Интерпретация полученных результатов I_g (ВПЧ на 100 тыс клеток)

Результат I_g (ВПЧ на 100 тыс клеток)	Трактовка
<3	Клинически малозначимая
3–5	Клинически значимая. Нельзя исключить дисплазию, существует риск развития дисплазии
>5	Клинически значимая, повышенная. Высокая вероятность наличия дисплазии

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования (количественного и качественного теста) считается достоверным, если получены правильные результаты для калибраторов, отрицательного контроля амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 12.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t		
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора ROX
B-	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K1, K2, K3	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Результаты количественного теста не подлежат учету если:

1. Значение концентрации ДНК человека в пробирке менее 10^3 ГЭ/реакция (значение, полученное для образцов по каналу ROX/Orange): взято недостаточное количество

клинического материала или произошел сбой при обработке пробы. Требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции ДНК.

2. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,9. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ!

1. Появление любого значения C_t по каналам FAM/Green, JOE/HEX/Yellow и/или ROX/Orange в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (К–) и/или для отрицательного контроля этапа экстракции (В–) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение C_t в таблице результатов для калибраторов ПЦР (**К1 ВПЧ 16, 18; К2 ВПЧ 16, 18; К3 ВПЧ 16, 18**) по каналам FAM/Green, JOE/HEX/Yellow и/или ROX/Orange отсутствует или превышает граничные значения, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК возбудителя.
3. Если для данного образца не определено значение порогового цикла C_t или оно превышает граничное значение по каналам FAM/Green и/или JOE/HEX/Yellow, а по каналу ROX/Orange получено значение C_t , превышающее граничное, необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа экстракции. Возможная причина – ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или наличие ингибиторов ПЦР.

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.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP и вариант FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F и вариант FRT-100 F хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме полимеразы (TaqF), ПЦР-смеси-1-FL ВПЧ 16/18 и ПЦР-смеси-2-FRT). Полимеразу (TaqF), ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18 и ПЦР-смесь-2-FRT хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL ВПЧ 16/18 хранить в защищенном от света месте.

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 набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁹.

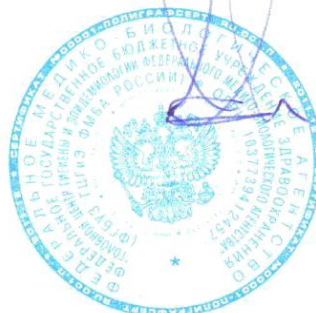
При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую 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
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «ДНК-сорб-АМ»

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 объемом **1,5 мл** (включая отрицательный контроль экстракции).
- ресуспендировать **сорбент универсальный** до гомогенной консистенции, внести в каждую пробирку по **300 мкл лизирующего раствора** и по **20 мкл сорбента универсального**, используя наконечники с фильтром. 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 объемом **1,5 мл** (включая отрицательный контроль экстракции) и, используя наконечник с фильтром, 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 фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести **100 мкл ОКО**, используя наконечник с фильтром.
 4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

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 фильтра.
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 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. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные пробы ДНК 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 пробами ДНК перенести в зону амплификации.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Изготовитель		