

«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

« 9 » марта 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для качественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	11
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	15
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	17
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	17
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	20
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	26
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	27
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	29
ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT	30
СОСТАВ.....	30
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	31
А. Подготовка реагентов	31
Б. Подготовка проб для амплификации	32
В. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	34
Г. Анализ и интерпретация результатов.....	35
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	39
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека)
ВПЧ ВКР	- вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» предназначен для качественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры), соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки, мазок со слизистой оболочки ротоглотки, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от женщин и мужчин после сексуального дебюта.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие биологического материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК ВПЧ ВКР и участка ДНК β -глобинового гена человека с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ДНК β -глобинового гена используется в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО Glob) и позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. ВКО Glob, являясь участком генома человека, должен всегда присутствовать в исследуемом материале в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток человека в образце (10^3 - 10^5 копий/мл).

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Определение типа ВПЧ ВКР для одного образца проводится в четырех пробирках, в каждой пробирке дифференцируются три типа ВПЧ ВКР и ВКО Glob. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Наименование ПЦР-смеси	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	ROX	Sy5
Выявляемая ДНК-мишень				
ВПЧ 16/18/31	ДНК ВПЧ ВКР тип 16	ДНК ВПЧ ВКР тип 31	ДНК ВПЧ ВКР тип 18	ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob)
ВПЧ 39/45/59	ДНК ВПЧ ВКР тип 39	ДНК ВПЧ ВКР тип 45	ДНК ВПЧ ВКР тип 59	ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob)
ВПЧ 33/35/56	ДНК ВПЧ ВКР тип 33	ДНК ВПЧ ВКР тип 35	ДНК ВПЧ ВКР тип 56	ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob)
ВПЧ 51/52/58	ДНК ВПЧ ВКР тип 58	ДНК ВПЧ ВКР тип 52	ДНК ВПЧ ВКР тип 51	ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob)
Область амплификации				
ВПЧ 16/18/31	E6 gene	E6 gene	E7 gene	ген β-глобина
ВПЧ 39/45/59	E7 gene	E6 gene	E6 gene	ген β-глобина
ВПЧ 33/35/56	E6 gene	E6/E7 gene	E1 gene	ген β-глобина
ВПЧ 51/52/58	E6 gene	E7 gene	E7 gene	ген β-глобина

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Примечание – Форма 1 удалена.

Форма 2 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 2 рассчитана на проведение 108 тестов (432 реакции амплификации), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл ¹
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры)	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ», «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта (соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс)	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)», Транспортная среда «Digene»	«ДНК-сорб-АМ», «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
	Транспортно-фиксирующая среда для жидкостной цитологии	«АмплиСенс® ДНК-сорб-Д», «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»		
Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ», «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	500
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»		1x10 ³
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов (клинические образцы, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей) в концентрации не менее 1×10^3 копий/мл. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК человека и следующих микроорганизмов:

- Штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США): *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Propionibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC® 29970™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 49907™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6305™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™ в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл;
- Штаммы из коллекции NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, Великобритания): *Human betaherpesvirus 5* NIBSC № 09/162, *Human gammaherpesvirus 4* NIBSC № 09/260 в концентрации не менее 5×10^5 МЕ/мл;
- Клинические изоляты, панели штаммов и изолятов: *Candida glabrata*, *Chlamydia trachomatis*, *Human alphaherpesvirus 1*, *Human alphaherpesvirus 2*, *Human alphaherpesvirus 3*, *Human betaherpesvirus 6A*, *Human betaherpesvirus 6B*, *Lactobacillus*

spp., *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, в концентрации не менее 5×10^5 копий/мл;

- ДНК человека в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл;
- ДНК ВПЧ, относящиеся к типам низкого, возможно высокого канцерогенного риска (возможно ВКР, possibly high carcinogenic) и вероятно высокого канцерогенного риска (вероятно ВКР, probably high carcinogenic), в частности типы 6, 8, 11, 15, 20, 26, 38, 44, 53, 66, 68, 73, 82 (клинические образцы, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей), в концентрации не менее 1×10^4 копий/мл.

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

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов, в качестве отрицательного образца использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Комплект для экстракции	Тип ВПЧ ВКР	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
			Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
«ДНК-сорб-АМ»	16	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	18	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	31	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	39	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	45	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	59	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	33	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	35	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	56	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	58	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	52	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	51	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
«Ампли-Сенс® МАГНО-сорб-УРО»	16	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	18	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	31	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	39	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	45	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	59	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	33	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	35	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	56	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	58	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	52	Положительные	10	100	30	100

		Отрицательные	10	100	30	100
	51	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
«Ампли- Сенс® ДНК-сорб- Д»	16	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	18	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	31	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	39	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	45	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	59	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	33	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	35	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	56	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	58	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
52	Положительные	10	100	30	100	
	Отрицательные	10	100	30	100	
51	Положительные	10	100	30	100	
	Отрицательные	10	100	30	100	
«РИБО- преп»	16	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	18	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	31	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	39	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	45	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	59	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	33	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	35	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	56	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	58	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
52	Положительные	10	100	30	100	
	Отрицательные	10	100	30	100	
51	Положительные	10	100	30	100	
	Отрицательные	10	100	30	100	

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора использованы образцы биологического материала: 421 образец отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры), 389 образцов соскобов эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки, 361 образец мазков со слизистой оболочки ротоглотки, 336 образцов тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала.

Исследуемые биологические образцы были получены:

- от женщин и мужчин, проходивших скрининг предраковых заболеваний, онкологической патологии шейки матки, влагалища, ануса, полового члена, головы и шеи ВПЧ-этиологии, у которых установлен цитологический диагноз H-SIL (High grade squamous intraepithelial lesion, высокая степень поражения плоско-клеточного интраэпителиального поражения) и L-SIL (Low grade squamous intraepithelial lesion, низкая степень плоскоклеточного интраэпителиального поражения) и выявлена ДНК ВПЧ ВКР с помощью референтного метода;
- от условно-здоровых женщин и мужчин, у которых установлен цитологический диагноз NILM (Negative for intraepithelial lesion or malignancy, негативные в отношении интраэпителиального поражения или злокачественности) и показано отсутствие ДНК ВПЧ ВКР с помощью референтного метода.

В качестве референтного метода использовались: набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ № РЗН 2017/6533) и набор реагентов для выявления, типирования и количественного определения вируса папилломы человека методом ПЦР (HPV КВАНТ), вариант исполнения: HPV квант-21 (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2010/08811).

Часть биологического материала была использована для приготовления модельных образцов. В образцы биологического материала были добавлены стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов, до конечных концентраций не менее 1×10^3 коп/мл (см. табл. 4, 5).

Таблица 4

**Результаты тестирования набора реагентов
«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL»
в сравнении с референтным методом**

Вид исследуемого материала	Тип ВПЧ ВКР	Результаты применения АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL		Результаты применения референтного метода	
				Положительных	Отрицательных
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	16	Всего исследовано 366 образцов	положительных	166	0
			отрицательных	0	200
	31	Всего исследовано 344 образца	положительных	143	0
			отрицательных	1	200
	18	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0
			отрицательных	0	200
	39	Всего исследовано 346 образцов	положительных	144	0
			отрицательных	2	200
	45	Всего исследовано 337 образцов	положительных	137	0
			отрицательных	0	200
	59	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0
			отрицательных	0	200
	33	Всего исследовано 345 образцов	положительных	145	0
			отрицательных	0	200
	35	Всего исследовано 333 образца	положительных	133	0
			отрицательных	0	200
	56	Всего исследовано 341 образец	положительных	141	0
			отрицательных	0	200
	58	Всего исследовано 337 образцов	положительных	137	0
			отрицательных	0	200
52	Всего исследовано 345 образцов	положительных	145	0	
		отрицательных	0	200	
51	Всего исследовано 342 образца	положительных	141	0	
		отрицательных	1	200	

Вид исследуемого материала	Тип ВПЧ ВКР	Результаты применения АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL		Результаты применения референтного метода	
				Положительных	Отрицательных
Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/ прямой кишки	16	Всего исследовано 347 образцов	положительных	146	0
			отрицательных	1	200
	31	Всего исследовано 329 образцов	положительных	128	0
			отрицательных	1	200
	18	Всего исследовано 334 образца	положительных	133	0
			отрицательных	1	200
	39	Всего исследовано 347 образцов	положительных	146	0
			отрицательных	1	200
	45	Всего исследовано 332 образца	положительных	131	0
			отрицательных	1	200
	59	Всего исследовано 330 образцов	положительных	129	0
			отрицательных	1	200
	33	Всего исследовано 335 образцов	положительных	134	0
			отрицательных	1	200
35	Всего исследовано 329 образцов	положительных	128	0	
		отрицательных	1	200	
56	Всего исследовано 335 образцов	положительных	134	0	
		отрицательных	1	200	
58	Всего исследовано 330 образцов	положительных	129	0	
		отрицательных	1	200	
52	Всего исследовано 330 образцов	положительных	129	0	
		отрицательных	1	200	
51	Всего исследовано 335 образцов	положительных	134	0	
		отрицательных	1	200	
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	16	Всего исследовано 347 образцов	положительных	147	0
			отрицательных	0	200
	31	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0
			отрицательных	0	200
	18	Всего исследовано 337 образцов	положительных	137	0
			отрицательных	0	200
	39	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0
			отрицательных	0	200
	45	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0
			отрицательных	0	200
	59	Всего исследовано 337 образцов	положительных	137	0
			отрицательных	0	200
	33	Всего исследовано 341 образец	положительных	141	0
			отрицательных	0	200
35	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0	
		отрицательных	0	200	
56	Всего исследовано 339 образцов	положительных	139	0	
		отрицательных	0	200	
58	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0	
		отрицательных	0	200	
52	Всего исследовано 338 образцов	положительных	138	0	
		отрицательных	0	200	
51	Всего исследовано 337 образцов	положительных	137	0	
		отрицательных	0	200	

Вид исследуемого материала	Тип ВПЧ ВКР	Результаты применения АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL		Результаты применения референтного метода	
				Положительных	Отрицательных
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный материал)	16	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	31	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	18	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	39	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	45	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	59	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	33	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	35	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	56	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	58	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	52	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200
	51	Всего исследовано 336 образцов	положительных	136	0
			отрицательных	0	200

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL»

Вид исследуемого материала	Тип ВПЧ ВКР	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	16	100 (97,80 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	31	99,31 (96,19 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	18	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	39	98,63 (95,14 – 99,83) %	100 (98,17 – 100) %
	45	100 (97,34 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	59	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	33	100 (97,49 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	35	100 (97,26 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	56	100 (97,42 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	58	100 (97,34 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	52	100 (97,49 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	51	99,30 (96,14 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %

Вид исследуемого материала	Тип ВПЧ ВКР	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала / прямой кишки	16	99,32 (96,27 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	31	99,22 (95,76 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	18	99,25 (95,91 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	39	99,32 (96,27 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	45	99,24 (95,85 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	59	99,23 (95,79 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	33	99,26 (95,94 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	35	99,22 (95,76 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	56	99,26 (95,94 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	58	99,23 (95,79 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
	52	99,23 (95,79 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %
51	99,26 (95,94 – 99,98) %	100 (98,17 – 100) %	
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	16	100 (97,52 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	31	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	18	100 (97,34 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	39	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	45	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	59	100 (97,34 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	33	100 (97,42 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	35	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	56	100 (97,38 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	58	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	52	100 (97,36 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
51	100 (97,34 – 100) %	100 (98,17 – 100) %	
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	16	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	31	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	18	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	39	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	45	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	59	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	33	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	35	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	56	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	58	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
	52	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %
51	100 (97,32 – 100) %	100 (98,17 – 100) %	

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике

инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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 использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого биологического материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514), Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011), транспортно-фиксирующая спиртосодержащая среда для жидкостной цитологии (например, жидкость консервирующая BD SurePath (Becton Dickinson and Company («Бектон Дикинсон энд Компани»), США (РУ № РЗН 2013/1335)) или аналогичная).

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

2. Щетка эндоцервикальная (например, Rovers Cervex-Brush Combi (Rovers Medical Devices B.V. («Роверс Медикал Девайсез Б.В.»), Нидерланды) или аналогичная).
3. Зонд гинекологический комбинированный (например, ЗГК «ЦМ» (ООО «ЦЕНТРИМЕД», Россия) или аналогичный).
4. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
5. Зонд уrogenитальный одноразовый стерильный, с рабочей частью в виде ершика со спиральным расположением нейлоновых ворсинок или ворса из флока, имеющий насечку для излома под пробирку типа «Эппендорф» (например, «Sorap flock technologies», Италия).
6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом от 2,0 до 5,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Набор для взятия цервикальных проб – DNAPAP Cervical Sampler (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

Предварительная подготовка исследуемого материала

8. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 и 5,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия) или аналогичные).
13. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия) или аналогичный).

14. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор лабораторный (например, TissueLyser LT, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичный).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

15. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» (РУ № РЗН 2016/3920), «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» (РУ № РЗН 2015/3503).

16. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

17. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

18. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – для приготовления реакционной смеси;

б) пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

20. Штативы для стрипов объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

22. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
24. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)).
25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
26. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
27. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры);
- соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки;
- мазок со слизистой оболочки ротоглотки;
- тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал.

Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс)

Доступ к цервикальному каналу обеспечить с помощью одноразового или многоразового стерильного гинекологического зеркала. Взятие материала провести с помощью цервикальной цитощетки или комбинированного гинекологического зонда в пробирку с транспортной средой. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном (допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови).

Способы взятия соскобов эпителия цервикального канала:

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

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

Третий способ – используется комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эктоцервикса и эндоцервикса и пробирка объемом 5 мл с 2,0 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс и эктоцервикс) поместить в пробирку с транспортной средой.

Четвертый способ – используется комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эктоцервикса, эндоцервикса и контейнер (виала) с транспортно-фиксирующей спиртосодержащей средой для жидкостной цитологии. Соскоб эпителия цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс) поместить в контейнер (виалу) с транспортной средой.

Рабочую часть цитощетки/зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке или контейнере (виале) с транспортной средой. Пробирку, контейнер (виалу) плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть цитощетки/зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стороне пробирки, контейнера (виалы), вращать 5-10 с по часовой и против часовой стрелки, чтобы максимально полно смыть биологический материал, после чего цитощечку/зонд удалить. Пробирку, контейнер (виалу) плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Допускается хранение образцов исследуемого материала, взятых в «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)», до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре от минус 20 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается хранение образцов исследуемого материала, взятых в транспортно-фиксирующую среду для жидкостной цитологии до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 6 месяцев.

Допускается хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции по применению к используемой транспортной среде.

Мазок со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или комбинированного зонда в пробирку с 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» с заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. После взятия мазка перенести зонд в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стороне пробирки, вращать 5-10 с, по часовой и против часовой стрелки, чтобы максимально полно смыть биологический материал, после чего зонд удалить. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

ВНИМАНИЕ! В случае использования «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» цвет жидкости может измениться при кислом pH отделяемого.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре от минус 20 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры

У женщин: перед взятием соскоба эпителиальных клеток необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища. Ввести рабочую часть зонда в уретру, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови.

У мужчин: перед взятием соскоба эпителиальных клеток обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Произвести массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удалить их сухим тампоном. Ввести рабочую часть зонда в уретру на глубину 1-2 см, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое. Допустимо присутствие примесей в виде слизи, крови и гноя.

После взятия соскоба зонд перенести в пробирку с 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стороне пробирки, вращать 5-10 с, по часовой и против часовой стрелки, чтобы максимально полно смыть биологический материал, после чего зонд удалить. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Допускается хранение образцов исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре от минус 20 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки

Перед взятием соскоба эпителиальных клеток необходимо провести тщательный туалет области вокруг анального отверстия с водой и мылом. Ввести зонд в анальное отверстие на глубину 3,0-4,0 см. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок анального (заднепроходного) канала и преддверия прямой кишки, максимально полно собирая отделяемое. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс. После взятия соскоба перенести зонд в пробирку с 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, по часовой и против часовой стрелки, чтобы максимально полно смыть биологический материал, после чего зонд удалить. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Допускается хранение образцов исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре от минус 20 °С и ниже – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание

материала.

Мазок со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие мазка производят при помощи сухого стерильного зонда-тампона вращательными движениями с поверхности небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия мазка рабочую часть зонда помещают в пробирку с 0,5 мл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков». Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, по часовой и против часовой стрелки, чтобы максимально полно смыть биологический материал, после чего зонд удалить. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Допускается хранение образцов исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал

Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка.

Образцы ткани диаметром не более 5 мм помещают в пробирки объемом 2 мл с добавлением 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Пробирку плотно закрывают. Для экстракции ДНК используют 100 мкл транспортной среды с фрагментом тканевого материала.

Образцы ткани диаметром более 5 мм помещают в

пластиковые контейнеры с широким горлом объемом не менее 50 мл.

Допускается хранение тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала до проведения предварительной обработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать кислый формалин для фиксации тканевого материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Мазки со слизистой оболочки влагалища, соскобы эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), соскобы эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры, соскобы эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал диаметром менее 5 мм, взятый в «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)», соскобы эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), взятые в транспортную среду «Digene», и мазки со слизистой оболочки ротоглотки, взятые в «Транспортную среду для респираторных мазков», не требуют предварительной подготовки.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал диаметром от 5 до 10 мм, соскобы эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), взятые в транспортно-фиксирующую среду для жидкостной цитологии, требуют предварительной подготовки.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал диаметром от 5 до 10 мм поместить в стерильную фарфоровую ступку и измельчить пестиком. В полученный гомогенат добавить 1,0 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и

тщательно перемешать пестиком. Для экстракции ДНК используют 100 мкл полученной суспензии.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов до проведения экстракции:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскоб эпителиальных клеток со слизистых оболочек цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), взятый в транспортно-фиксирующую среду для жидкостной цитологии

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

Информацию о порядке подготовки исследуемого материала к экстракции ДНК смотрите в инструкции к используемому комплекту реагентов для экстракции («АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» или «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»).

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются образцы, содержащие более 10 % слизи или фекалий, 10 % анузола, 5 % формалина.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 6).

Протестированы модельные образцы отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс), соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры), соскобов эпителиальных клеток со слизистой оболочки

анального канала/прямой кишки, мазков со слизистой оболочки ротоглотки, тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Модельные образцы содержали стандартные образцы предприятия ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов с концентрацией 1×10^3 копий/мл каждого.

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции			
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	Эндогенные вещества	Слизь	20%	<u>Обнаружено</u>			
			10%	Не обнаружено			
	Эндогенные / экзогенные вещества	Сперма	20%	Не обнаружено			
					Цельная кровь	20%	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Нистатин	20%	Не обнаружено			
					Лубрикант Contex Wave	20%	Не обнаружено
Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала / прямой кишки	Эндогенные вещества	Фекалии	20%	<u>Обнаружено</u>			
			10%	Не обнаружено			
		Слизь	20%	<u>Обнаружено</u>			
			10%	Не обнаружено			
	Экзогенные вещества	Цельная кровь	20%	Не обнаружено			
			Анузол	20%	<u>Обнаружено</u>		
				10%	Не обнаружено		
Лубрикант Contex Wave	20%	Не обнаружено					
			Глицерин	20%	Не обнаружено		
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Эндогенные вещества	Слизь	20%	<u>Обнаружено</u>			
			10%	Не обнаружено			
	Экзогенные вещества	Хлоргексидин	20%	Не обнаружено			
					Стоматофит	20%	Не обнаружено
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	Эндогенные вещества	Слизь	20%	<u>Обнаружено</u>			
			10%	Не обнаружено			
		Цельная кровь	20%	Не обнаружено			
	Экзогенные вещества		Формалин	10%	<u>Обнаружено</u>		
				5%	Не обнаружено		

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной

- детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты реагентов для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала, объемы исследуемого образца, отрицательного контроля экстракции (ОК) и объем элюции указаны в табл. 7. В качестве ОК используется реагент ОКО.

Таблица 7

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Объем исследуемого образца, мкл	Объем отрицательного контроля экстракции (ОК), мкл	Объем элюции, мкл
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта (мазок со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки уретры)	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	100	100	100
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	100	100	100
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта (соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикс и эндоцервикс)	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)», Транспортная среда «Digene»	«ДНК-сорб-АМ»	100	100	100
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	100	100	100
	Транспортно-фиксирующая среда для жидкостной цитологии	«АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»	1000*	100	100
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	1000*	100	100
Соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки анального канала/прямой кишки	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	100	100	100
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	100	100	100
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«РИБО-преп»	100	100	50
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	100	100	100
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«РИБО-преп»	100	100	50

* Объем и порядок подготовки исследуемого материала см. в инструкции к комплекту реагентов для экстракции.

ВНИМАНИЕ! Добавление внутреннего контрольного образца не требуется.

ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации участков ДНК ВПЧ ВКР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВПЧ 16/18/31	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,08	6 пробирок синяя крышка
ПЦР-смесь ВПЧ 39/45/59	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,08	6 пробирок сиреневая крышка
ПЦР-смесь ВПЧ 33/35/56	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,08	6 пробирок зеленая крышка
ПЦР-смесь-ВПЧ 51/52/58	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,08	6 пробирок оранжевая крышка
ПЦР-буфер-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	1,1	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
К+ ВПЧ 16/18/31	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К+ ВПЧ 39/45/59	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К+ ВПЧ 33/35/56	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К+ ВПЧ 51/52/58	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

К комплекту реагентов прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя электронный калькулятор в формате Microsoft® Excel для автоматической обработки результатов.

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на

бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок (стрипов) 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. **Общий объем реакционной смеси – 13 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.**

А. Подготовка реагентов

1. Для исследования 16 образцов с учетом контролей и запаса:

- смешать в отдельной пробирке **350 мкл ПЦР-буфера-FRT** и **25 мкл полимеразы (TaqF)**. Полученную смесь аккуратно перемешать на вортексе, не допуская вспенивания;
- в каждую из четырех пробирок с ПЦР-смесью ВПЧ (синяя, сиреневая, зеленая и оранжевая крышки) добавить по **90 мкл смеси ПЦР-буфера-FRT** и **полимеразы (TaqF)**, аккуратно перемешать на вортексе, не допуская вспенивания.

Примечание – Допускается полностью перенести содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (60 мкл)** в пробирку с **ПЦР-буфером-FRT (1100 мкл)**, промаркировать с указанием даты приготовления. Смесь хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости. Приготовленная смесь рассчитана на исследование 54 образцов, включая контроли (3 раза по 18 образцов).

2. Для исследования менее 16 образцов:

- приготовить смесь **ПЦР-буфера-FRT** и **полимеразы (TaqF)** на нужное количество образцов и контролей из расчета на один образец / контроль (стрип из 4 пробирок) **19,6 мкл ПЦР-буфера-FRT** и **1,4 мкл полимеразы (TaqF)**. Полученную смесь аккуратно перемешать на вортексе, не допуская вспенивания;
- в четырех отдельных пробирках подготовить реакционные

смеси из расчета на каждую реакцию 3,5 мкл ПЦР-смеси ВПЧ, 4,5 мкл смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF). Смесь готовить на общее число исследуемых образцов и контролей ПЦР плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-смеси ВПЧ с ПЦР-буфером-FRT и полимеразой (TaqF) должна быть использована в течение 2 ч после приготовления.

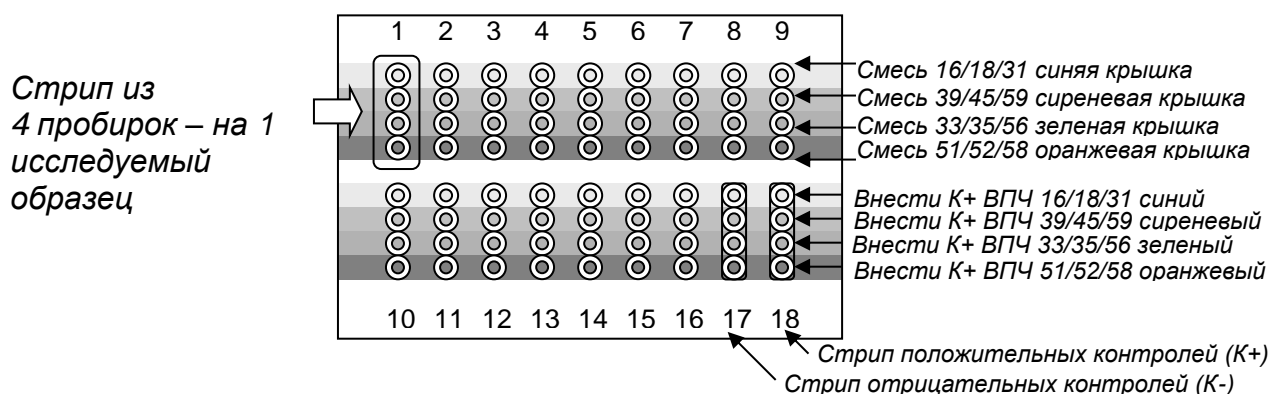
Б. Подготовка проб для амплификации

ВНИМАНИЕ! Для амплификаторов Rotor-Gene использовать пробирки объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт.

1. Внести реакционные смеси и ДНК-пробы в пробирки (стрипы) для ПЦР согласно приведенным ниже схемам.

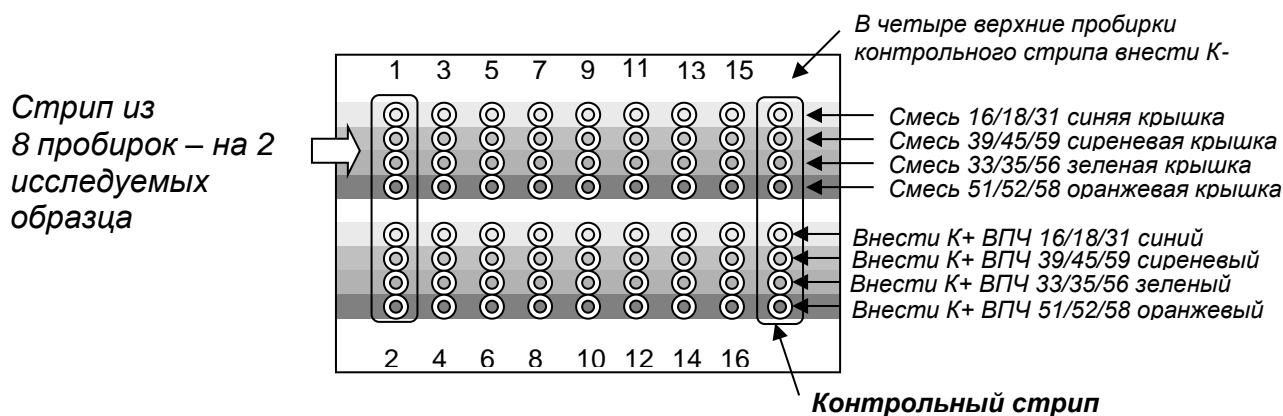
ВНИМАНИЕ! Для адекватной обработки результатов исследования с помощью электронного калькулятора необходимо строго следовать приведенным ниже схемам внесения реакционных смесей и проб ДНК.

а) **Схема внесения смесей и проб ДНК для прибора роторного типа:** Установите стрипованные по 4 пробирки 0,1 мл (стрипы) в штатив как показано на схеме. Количество стрипов для исследования 16 образцов – 18 (для исследования N образцов: N + 2 стрипа для контролей).



б) **Схема внесения смесей и проб ДНК для прибора планшетного типа:** Установите стрипованные по 8 пробирки (стрипы) в штатив как показано на схеме. Количество стрипов для исследования 16 образцов – 9 (для исследования N образцов: N/2 + 1 стрип для

контролей).



2. В первую пробирку каждого стрипа внести по **8 мкл** смеси 16/18/31 (синяя крышка), во вторую – **8 мкл** смеси 39/45/59 (сиреневая крышка), в третью – **8 мкл** смеси 33/35/56 (зеленая крышка), в четвертую – **8 мкл** смеси 51/52/58 (оранжевая крышка). (В случае стрипа по 8 пробирок, в пробирки 5, 6, 7, 8 смеси вносятся аналогично).
3. В каждую из четырех пробирок с различными ПЦР-смесями внести по **5 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и отрицательного контроля экстракции (ОК).

Примечание – ОК ставится один раз на сессию экстракции.

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

4. Поставить контрольные реакции (см. схемы).
 - а) **Отрицательные контроли ПЦР** (стрип отрицательных контролей/контрольный стрип) – в четыре пробирки с различными ПЦР-смесями внести по **5 мкл К–**.
 - б) **Положительные контроли ПЦР** (стрип положительных контролей/контрольный стрип):
 - в пробирку с «синей» смесью (первая) внести **5 мкл К+** ВПЧ 16/18/31,
 - в пробирку с «сиреневой» смесью (вторая) внести **5 мкл К+** ВПЧ 39/45/59,
 - в пробирку с «зеленой» смесью (третья) внести **5 мкл К+** ВПЧ 33/35/56,
 - в пробирку с «оранжевой» смесью (четвертая) внести

5 мкл К+ ВПЧ 51/52/58.

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

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

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ³			Приборы планшетного типа ⁴		
	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE**, **ROX** и **Sy5**.

ВНИМАНИЕ! Программа «АмплиСенс-1» (см. табл. 8) является **универсальной** для проведения тестов с помощью комплектов реагентов «АмплиСенс» для выявления и типирования ВПЧ ВКР и выявления ДНК возбудителей ИППП. Поэтому можно одновременно в одном планшетном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется сочетать несколько тестов в одной постановке в приборах роторного типа.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить

³ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁴ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

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

Г. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

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

Таблица 9

Наименование ПЦР-смеси	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	ROX	Cy5
ВПЧ 16/18/31	ДНК ВПЧ ВКР тип 16	ДНК ВПЧ ВКР тип 31	ДНК ВПЧ ВКР тип 18	ДНК ВКО Glob
ВПЧ 39/45/59	ДНК ВПЧ ВКР тип 39	ДНК ВПЧ ВКР тип 45	ДНК ВПЧ ВКР тип 59	ДНК ВКО Glob
ВПЧ 33/35/56	ДНК ВПЧ ВКР тип 33	ДНК ВПЧ ВКР тип 35	ДНК ВПЧ ВКР тип 56	ДНК ВКО Glob
ВПЧ 51/52/58	ДНК ВПЧ ВКР тип 58	ДНК ВПЧ ВКР тип 52	ДНК ВПЧ ВКР тип 51	ДНК ВКО Glob

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

ВНИМАНИЕ! Анализ результатов проводить с помощью приведенного ниже алгоритма или с помощью электронного калькулятора в формате Microsoft® Excel для автоматической обработки результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Наименование ПЦР-смеси	Результат
FAM	JOE	ROX	Sy5		
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ВПЧ 16/18/31	ДНК ВПЧ ВКР НЕ обнаружена
				ВПЧ 39/45/59	
				ВПЧ 33/35/56	
				ВПЧ 51/52/58	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	ВПЧ 16/18/31	ДНК ВПЧ ВКР 16 типа обнаружена
				ВПЧ 39/45/59	ДНК ВПЧ ВКР 39 типа обнаружена
				ВПЧ 33/35/56	ДНК ВПЧ ВКР 33 типа обнаружена
				ВПЧ 51/52/58	ДНК ВПЧ ВКР 58 типа обнаружена
отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	ВПЧ 16/18/31	ДНК ВПЧ ВКР 31 типа обнаружена
				ВПЧ 39/45/59	ДНК ВПЧ ВКР 45 типа обнаружена
				ВПЧ 33/35/56	ДНК ВПЧ ВКР 35 типа обнаружена
				ВПЧ 51/52/58	ДНК ВПЧ ВКР 52 типа обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ВПЧ 16/18/31	ДНК ВПЧ ВКР 18 типа обнаружена
				ВПЧ 39/45/59	ДНК ВПЧ ВКР 59 типа обнаружена
				ВПЧ 33/35/56	ДНК ВПЧ ВКР 56 типа обнаружена
				ВПЧ 51/52/58	ДНК ВПЧ ВКР 51 типа обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	ВПЧ 16/18/31	Невалидный*
				ВПЧ 39/45/59	
				ВПЧ 33/35/56	
				ВПЧ 51/52/58	

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторении невалидного результата для данного образца необходимо провести повторное взятие биологического материала.

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

Результат ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов

экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 11 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 11

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора, <i>Ct</i>			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует во всех 4-х пробирках	отсутствует во всех 4-х пробирках	отсутствует во всех 4-х пробирках	отсутствует во всех 4-х пробирках
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного во всех 4-х пробирках	<u>определено</u> меньше граничного во всех 4-х пробирках	<u>определено</u> меньше граничного во всех 4-х пробирках	<u>определено</u> меньше граничного во всех 4-х пробирках
K-	ПЦР	отсутствует во всех 4-х пробирках	отсутствует во всех 4-х пробирках	отсутствует во всех 4-х пробирках	отсутствует во всех 4-х пробирках

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 11) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять

меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

«ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме полимеразы (TaqF), ПЦР-смеси ВПЧ 16/18/31, ПЦР-смеси ВПЧ 39/45/59, ПЦР-смеси ВПЧ 33/35/56, ПЦР-смеси ВПЧ 51/52/58. Полимеразу (TaqF), ПЦР-смесь ВПЧ 16/18/31, ПЦР-смесь ВПЧ 39/45/59, ПЦР-смесь ВПЧ 33/35/56, ПЦР-смесь ВПЧ 51/52/58 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь ВПЧ 16/18/31, ПЦР-смесь ВПЧ 39/45/59, ПЦР-смесь ВПЧ 33/35/56, ПЦР-смесь ВПЧ 51/52/58 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: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции AmpliSens® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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 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.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно!
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления