

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от 09.10.13г. № 5721-Пп/13

УТВЕРЖДАЮ  
Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
В.И. Покровский  
«23» октября 2013 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ)  
высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,  
52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 типов в биологическом материале  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
электрофоретической детекцией продуктов амплификации в  
агарозном геле

**«АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EPH»**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	10
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ .....	15
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	15
Б. Проведение амплификации.....	15
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	17
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	21
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	25

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВПЧ	- вирус папилломы человека
ВКР	- высокий канцерогенный риск
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РШМ	- рак шейки матки
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
EP <sub>h</sub>	- электрофоретическая детекция

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EP<sub>h</sub>» предназначен для выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Набор реагентов способен выявлять ДНК ВПЧ трех основных филогенетических групп – А7, А6, А9, которые включают следующие типы – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70. Эти типы обладают высокой трансформирующей активностью и ответственны за более чем 97 % случаев тяжелых цервикальных дисплазий и рака шейки матки. В наборе реагентов используется эндогенный внутренний контроль (участок β-глобинового гена).

**ВНИМАНИЕ!** Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания<sup>1</sup>.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) электрофоретической детекцией включает в себя 3 этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию участка ДНК ВПЧ ВКР и электрофоретическую детекцию.

<sup>1</sup> В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участков ДНК E1-E2 генов трех групп ВПЧ и участка ДНК β-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК четырнадцати типов ВПЧ проводится **в одной пробирке. Все амплифицируемые фрагменты имеют сходную длину.**

**Определение клинически-значимого количества вируса с использованием набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EPH».**

Современные эпидемиологические данные показывают, что в большинстве случаев при проведении *диспансерного (скринингового) обследования* на наличие диспластических изменений шейки матки, влагалища и вульвы, а также риска их развития необходимо выявление лишь *клинически-значимого* количества вируса папилломы человека высокого риска. Считается, что выявление вируса в количестве, не превышающем определенное пороговое значение, имеет небольшое клиническое значение, так как практически в 100 % случаев ассоциировано с самостоятельным спонтанным излечением. Напротив, вирусная нагрузка выше порога является свидетельством наличия дисплазии или вероятности ее развития. Однако, в случае, если речь идет не о профилактическом (скрининговом) обследовании, а о *контроле лечения*, выявление вируса даже с низкой нагрузкой может быть ранним маркером рецидива. На сегодняшний день порогом клинически значимого количества вируса считается уровень порядка  $10^5$  ГЭ ВПЧ ВКР/соскоб цервикального канала при условии **стандартности взятия материала**. В ходе исследований, проведенных при апробации набора реагентов на моделях клинических образцов, было показано, что при стандартном заборе соскоба цервикального канала в 0,5 мл транспортной среды, последующей экстракции ДНК, 100-кратного разведения экстрагированной ДНК в К- и проведении ПЦР-анализа с использованием комплекта реагентов для амплификации «ПЦР-комплект» позволяет выявлять только клинически значимое количество вируса. Апробация данной методики на *клинических образцах здоровых пациенток и пациенток с тяжелыми дисплазиями и РШМ* показала повышение специфичности выявления дисплазии на 22,9 % (с 61,7 % без разведений до 84,6 % с разведениями) при сохранении чувствительности выявления тяжелой дисплазии и

РШМ на высоком уровне (98,9 %).

**ВНИМАНИЕ!** Порог клинически значимого количества вируса не валидирован для исследования соскобов, полученных у мужчин.

Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EPH» позволяет выявлять ВПЧ высокий канцерогенный риск в формате:

- «Присутствие ВПЧ ВКР» – исследуется образец непосредственно после экстракции;
- «Клинически значимое количество ВПЧ ВКР» – исследуется образец после экстракции ДНК, разведенный в 100 раз в К-. Однако следует учитывать, что для проведения определения клинически значимого количества вируса материал должен забираться стандартно (см. раздел «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала»).

Специфический продукт амплификации имеет определенный размер и детектируется методом электрофореза в агарозном геле.

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Химически модифицированная полимеразы (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

## **ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 F, «ЭФ» вариант 200.

**Форма 2** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 F.

**Форма 3** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 F.

**Форма 4** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из

биологического материала, амплификацию ДНК и электрофоретическую детекцию.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для амплификации ДНК. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК и электрофоретической детекции, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

**ВНИМАНИЕ!** Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами 2 и 3 гарантируются только в случае применения дополнительных комплектов реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2013) и «ЭФ» (ТУ 9398-070-01897593-2013) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Комплект реагентов для экстракции РНК	Комплект реагентов для амплификации	Аналитическая чувствительность, <sup>2</sup> ГЭ/мл	Комплект для детекции	Пробоподготовка материала
Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), соскоб эпителия с поверхности шейки матки (экзоцервикс)	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект»	2,5x10 <sup>4</sup>	«ЭФ» 200	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы
Соскоб эпителия уретры					

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования

<sup>2</sup>Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца биологического материала.

биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 или реактивы, 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 трех отдельных помещениях (зонах). Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза. Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы (включая буфер и гели) следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.
- При работе с включенным трансиллюминатором пользоваться защитным экраном или защитной маской.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **ЗОНА 1.**

**Для экстракции ДНК из проб требуются:**

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия).
5. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного



- объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, США).
  8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Ахуген, США).
  9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Ахуген, США).
  10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл (например, Ахуген, США).
  11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  12. Отдельный халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
  13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

## **ЗОНА 2.**

### **Для проведения амплификации требуются:**

1. Программируемый амплификатор для пробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия, или эквивалентный); для пробирок 0,2 мл (например, GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, США, или MaxyGene, Ахуген», США).
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл (например, Ахуген, США).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл (например, Ахуген, США).
7. Штативы для наконечников (например, Ахуген, США), штативы для пробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и штативы для пробирок объемом 0,2 мл и 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Ахуген, США).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

### **ЗОНА 3.**

**Для детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле требуются:**

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, SE-2, «Хеликон», Россия).
2. Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия).
4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов («Биотест-1», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия; BioRad, США).
5. Аквадистиллятор.
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
10. Штатив для микропробирок на 0,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
11. Автоматический дозатор переменного объема (от 10 до 40 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
12. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе (например, Axugen, США).
13. Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
14. Отдельный халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

### **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат:

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

**Первый способ** – используется комплект для взятия образцов, содержащий одну/две цервикальные цитощетки и пробирку на

2 мл с «Транспортной средой для мазков» в объеме 0,5 мл.  
Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый одной цервикальной цитощеткой, и/или соскоб эпителия с поверхности шейки матки (экзоцервикс), взятый второй цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощеток обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

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

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

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

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

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

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

**У мужчин**: соскоб эпителия уретры, взятый универсальным зондом, поместить в пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для мазков» 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 от минус 24 °С до минус 16 °С – в течение года. Допускается только однократное

замораживание-оттаивание материала.

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

Для обработки взятого биологического материала используются следующие комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- **«ДНК-сорб-АМ»** – для биологического материала, полученного первым, вторым и третьим способом. Также для указанного материала допускается использование комплекта реагентов **«ДНК-сорб-В»**;
- **«ДНК-сорб-С»** – для биоптатов слизистой;
- **«ДНК-сорб-Д»** – для обработки образцов жидкостной цитологии.

## СОСТАВ

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<b>«ДНК-сорб-АМ» вариант 100</b>	
		<i>Объём (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
<b>Лизирующий раствор</b>	Прозрачная бесцветная жидкость*	30	1 флакон
<b>Отмывочный раствор</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
<b>Сорбент универсальный</b>	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
<b>Буфер для элюции В</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 F или 100 F** – комплект реагентов для амплификации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 типов **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<b>«ПЦР-комплект» вариант 50 F</b>		<b>«ПЦР-комплект» вариант 100 F</b>	
		<i>Объём (мл)</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Объём (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ПЦР-смесь-1 ВПЧ ВКР скрин</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка	0,3	2 пробирки
<b>2,5x ПЦР-буфер blue</b>	Прозрачная жидкость синего цвета	0,6	1 пробирка	1,15	1 пробирка
<b>Полимераза (TaqF)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка	0,06	1 пробирка
<b>Минеральное масло для ПЦР</b>	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка	4,0	1 пробирка
<b>K+ ВПЧ 31, 39, 56 / Glob</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка
<b>K+ Glob</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка
<b>K–</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки	5,0	4 пробирки

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

Комплект реагентов вариант 50 F рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 100 F рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

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

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

**Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200** – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл), масса (г)</i>	<i>Кол-во</i>
<b>Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия</b>	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
<b>Агароза для электрофореза ДНК</b>	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- Проведение амплификации,
- Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле.

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Порядок работы см. в приложении 1.

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- **«ДНК-сорб-АМ»** - для обработки биологического материала, полученного первым, вторым и третьим способом. Также для указанного материала допускается использование комплекта реагентов **«ДНК-сорб-В»**;
- **«ДНК-сорб-С»** – для обработки биоптатов слизистой;
- **«ДНК-сорб-Д»** – для обработки образцов жидкостной цитологии.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

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

### А. Подготовка пробирок для амплификации

1. Подготовить реакционную смесь. При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается постановкой трех контрольных точек (**отрицательного и двух положительных контролей**). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке  $5*(N+1)$  мкл ПЦР-смеси-1 ВПЧ ВКР скрин,  $10*(N+1)$  мкл 2,5x ПЦР-буфера blue и  $0,5*(N+1)$  мкл полимеразы (TaqF).

**ВНИМАНИЕ!** Приготовленную смесь хранить не более 2 ч.

2. Перемешать смесь на вортексе и раскапать по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.
3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой, минеральное масло можно не добавлять.
4. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтрами, внести по 10 мкл ДНК-проб, экстрагированных из исследуемых или контрольных проб этапа экстракции ДНК (в случае исследования в формате «Клинически значимое количество ВПЧ ВКР» в качестве ДНК-проб берутся полученные 100-кратные разведения экстрагированных ДНК).
5. Поставить контрольные реакции амплификации:
  - а) отрицательный контроль (К-) – вместо ДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 10 мкл К-.
  - б) контроль амплификации ДНК человека (ВПЧ-) – внести в пробирку 10 мкл К+ Glob.
  - в) положительный контроль (ВПЧ+) – внести в пробирку 10 мкл К+ ВПЧ 31, 39, 56 / Glob.

### Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1).

2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

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

Время амплификации на амплификаторе с регулированием температур по матрице примерно 2 ч 30 мин, на амплификаторе с активным регулированием – 1 ч 50 мин.

**Таблица 1**

**Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР  
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 типов**

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):				Амплификаторы с матричным регулированием температуры:					
«Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), MaxyGene (Axygen)			PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra)			
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
1	95 °С	900 с	1	95 °С	900 с	1	95 °С	900 с	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	15 с	42	95 °С	30 с	42
	63 °С	20 с		63 °С	30 с		63 °С	40 с	
	72 °С	20 с		72 °С	30 с		72 °С	40 с	
3	72 °С	60 с	1	72 °С	60 с	1	71 °С	60 с	1

4. После окончания реакции собрать пробирки в штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР-амплификации (**ЗОНУ 3**).

Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Параметры геля должны быть следующие:

Длина геля – не менее 3 см,

Концентрация геля – не менее 1,8 %,

Лидирующий краситель ксиленцианол необходимо гнать до середины геля (т.е. на 1,5 см).



## **ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ**

Для проведения электрофоретической детекции продуктов амплификации используется комплект реагентов «ЭФ» (вариант 200) в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов.

При использовании формы комплектации набора 1 для проведения электрофоретической детекции продуктов амплификации применяется входящий в набор комплект реагентов «ЭФ» (вариант 200).

Для проведения электрофоретической детекции продуктов амплификации используется комплект реагентов «ЭФ» (вариант 200) в соответствии с **приложением 2** «Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ».

### **ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Интерпретация результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

В пробирке с ПЦР-смесью-1 ВПЧ ВКР скрин находятся праймеры для амплификации фрагментов ДНК **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70** типов и праймеры для амплификации фрагмента ДНК участка генома человека ( $\beta$ -глобинового гена).

#### **Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:**

Внутренний контроль (фрагмент  $\beta$ -глобинового гена) – **723 п.н.**

ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70 типов – от **267 до 325 п.н.**

- 1. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К–), не должно быть никаких полос.**
- 2. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (ВПЧ+) должна быть полоса положительного контроля – от 267 до 325 п.н. и полоса K+ Glob на уровне 723 п.н.**
- 3. В дорожке, соответствующей контролю амплификации ДНК человека (ВПЧ–) должна быть только полоса K+ Glob – 723 п.н.**
- 4. Положительными считаются образцы, которые содержат**

специфическую светящуюся полосу на уровне **от 267 до 325 п.н.** большей или меньшей интенсивности независимо от наличия полосы внутреннего контроля.

5. **Отрицательными** считаются образцы, которые содержат только полосу внутреннего контроля – **723 п.н.**
6. Кроме специфических полос в дорожках могут наблюдаться полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

**Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:**

1. Если результаты анализа контрольных точек (ВПЧ–, ВПЧ+) не совпадают с приведенными выше, то соответствующий этап анализа (амплификацию) следует переделать.
2. Если в дорожке какого-либо из исследуемых образцов отсутствует полоса внутреннего контроля (**723 п.н.**) – это означает, что был плохо взят биологический материал, недостаточное количество эпителиальных клеток или ошибка на этапе экстракции ДНК, постановки ПЦР.
3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» вследствие неправильного хранения реагентов или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
4. Если в отрицательном контроле (К–) выявляются специфические полосы, значит, произошла контаминация реактивов или образцов. Результаты анализа считают недействительными. Требуется повторить анализ образцов, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** 9 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.

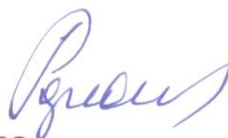
**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» (кроме полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-ЕPh» направлять в адрес предприятия-изготовителя ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: [products@pcr.ru](mailto:products@pcr.ru))<sup>3</sup>.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Л. Никонов

<sup>3</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Дата изготовления
	Код партии		Максимальное число тестов
	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Производитель		

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Порядок работы при экстракции ДНК из проб

Работа проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала.

Объем пробы, необходимый для экстракции ДНК, – 0,1 мл.

#### Порядок работы.

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

#### Способ 1:

- отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль экстракции).
- ресуспендировать **сорбент универсальный** до гомогенной консистенции, внести в каждую пробирку по **20 мкл сорбента универсального** и по **300 мкл лизирующего раствора**, 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 или 1 мл на 15 мл лизирующего раствора) предварительно гомогенизированного сорбента универсального и перемешать. Допускается хранение полученной смеси в течение 2 сут при комнатной температуре. Перед применением тщательно перемешать.
  - отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль 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 (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**, используя наконечник с фильтром.
  4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и инкубировать **5 мин при температуре 65 °С** в термостате. После окончания инкубации перемешать на вортексе и

- поставить в штатив на **2 мин.**
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин в течение 30 с.** Не захватывая сорбент универсальный, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без 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 буфера для элюции В.** 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 (ДНК-проба). Указанный материал готов к постановке ПЦР.

**ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.**

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Работа проводится в ЗОНЕ 3 - помещении для детекции продуктов амплификации.

**ВНИМАНИЕ! РАБОТА С АМПЛИФИЦИРОВАННЫМИ ДНК ДОЛЖНА ПРОВОДИТЬСЯ В ОТДЕЛЬНОЙ КОМНАТЕ, СОТРУДНИКОМ ЛАБОРАТОРИИ, НЕ ПРОИЗВОДЯЩИМ МАНИПУЛЯЦИЙ В ЗОНЕ 1 И ЗОНЕ 2.**

**Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.**

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

**ВНИМАНИЕ! Бромид этидия** – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке.

2. **Агарозу для электрофореза ДНК** из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 65-70 °С.
3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **3 см** друг от друга. Толщина геля должна быть

около 0,6 см.

4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

### **Порядок работы.**

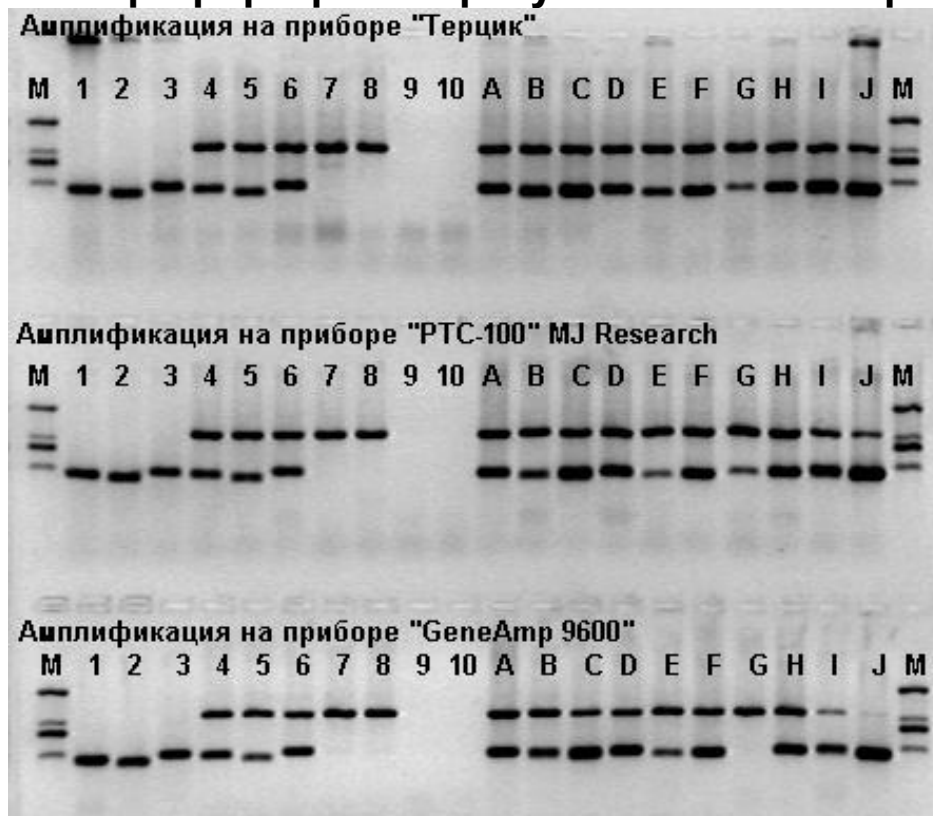
1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10–15 мкл пробы** и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждого образца). В **каждом** ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен **K+** и, желательно, маркер молекулярных масс (с набором не поставляется).
2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Если нет нарушения контактов, то при прохождении тока от электродов должны подниматься пузырьки. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см. При использовании камеры SE-2 («Хеликон») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин.
3. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля – 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

**ВНИМАНИЕ!** При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!



### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

#### Электрофореграмма результатов амплификации.



Обозначения:

№ 1 – К+ ВПЧ 31

№ 2 – К+ ВПЧ 39

№ 3 – К+ ВПЧ 56

№ 4 – К+ ВПЧ 31, разведенный в 10 раз ДНК плаценты человека

№ 5 – К+ ВПЧ 39, разведенный в 10 раз ДНК плаценты человека

№ 6 – К+ ВПЧ 56, разведенный в 10 раз ДНК плаценты человека

№№ 7, 8 – ДНК плаценты человека

№№ 9, 10 – К-

А – J – ДНК из клинических ВПЧ-положительных образцов, экстрагированная с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-А».

### Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
01.08.17 ТА	Нижний колонтитул	Добавлен новый каталожный номер <b>REF</b> Н-0523-4