

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления, дифференциации и количественного  
определения ДНК вируса папилломы человека  
в биологическом материале методом полимеразной цепной  
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL»**

**АмплиСенс®**



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



Только для исследовательских и  
иных немедицинских целей

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ....	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК .....	9
ФОРМАТ FRT .....	11
СОСТАВ .....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	17
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	18
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	24
Приложение 1 .....	25

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВПЧ ВКР	- вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
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-титр-FL» предназначен для выявления, дифференциации и количественного определения ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) в биологическом материале (соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта, образцы биопсийного материала слизистой шейки матки) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) в одной пробирке участков ДНК 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,66 ,68 генотипов ВПЧ и участка ДНК β-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. ПЦР-исследование на наличие ДНК четырнадцати генотипов ВПЧ проводится в четырех пробирках. Каждый генотип регистрируется по своему каналу флуоресценции, что позволяет не только выявлять, но и определять генотип обнаруженного вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска, а также определять его концентрацию. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце (цервикальный соскоб) в достаточном количестве, эквивалентном количеству

клеток в мазке ( $10^3 - 10^5$  геномов). Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (экстракция ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. В случаях, если соскоб эпителия забран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток), сигнал амплификации  $\beta$ -глобинового гена будет низким.

Количественное определение ДНК ВПЧ ВКР методом ПЦР в «реальном времени» основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК ВПЧ ВКР из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

## **ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**Набор реагентов выпускается в 1 формате:**

### **Формат FRT**

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

**Форма 2** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

**Форма 3** 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 методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК ВПЧ ВКР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК ВПЧ ВКР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность и линейный диапазон измерения

Вид биологического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Линейный диапазон измерения ДНК ВПЧ, копий/мл
Соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	1000	1000-100000000

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК ВПЧ 16,18,31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов. Аналитическая специфичность набора была исследована посредством добавления в реакцию ДНК/РНК различных микроорганизмов (аденовирус типы 2, 3 и 7, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус ветряной оспы, вирус гепатита В, С, вирус иммунодефицита человека первого типа, вирус герпеса человека типы 6 и 8, вирус простого герпеса, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, ДНК вирусов папилломы человека рода  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  (1, 3, 4, 5, 8, 37, 38, 65, 20, 24, 49, 50, 15), рода  $\alpha$  низкого и неустановленного риска (6, 11, 26,

53, 7, 27, 10, 70, 67) в концентрации  $10^8$  копий ДНК ВПЧ на мл). Перекрестных реакций при этом не наблюдалось.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

При работе 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 отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы 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<sup>1)</sup>. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- 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**

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ТУ 9398-098-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в

---

<sup>1)</sup> Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

- зависимости от вида исследуемого материала – при работе с формой комплектации 1.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
  4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
  5. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
  6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
  7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл (например, Ахуген, США).
  8. Штативы для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
  9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
  10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
  11. Емкость для сброса наконечников.
  12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
  13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,1 мл или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с оптически прозрачными крышками.
    - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с оптически прозрачными крышками (например, Ахуген, США)– при использовании прибора планшетного типа;
    - б) пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в



стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

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

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

Материалом для исследования служат: соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (соскоб из цервикального канала, отделяемое влагалища, соскобы эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища, соскоб эпителия уретры), образцы биопсийного материала слизистой шейки матки.

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК**

Для проведения анализа используется следующий биологический материал:

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

**Первый способ** – используется комплект для взятия образцов, содержащий одну или две цервикальные цитощетки и пробирку на 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)» в объеме 0,5 мл.

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

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

Соскоб 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-/экзоцервикса и пробирку на 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)» в объеме 0,5 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 самостоятельного взятия материала «Я сама» в соответствии с прилагаемой инструкцией.

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

Соскоб 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 с муколитиком (ТСМ)» в объеме 0,5 мл.

Условия хранения проб:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 5 сут;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 20 сут;
- при температуре от минус 24 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.

**ФОРМАТ FRT  
СОСТАВ**

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная жидкость от бесцветного до желтого или розового цвета	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия от белого до темно-бежевого цвета	1,0	2 пробирки
TE-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации, дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ ВКР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
ПЦР-смесь-FL ВПЧ 16,18,31 / Glob	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-FL ВПЧ 39,45,59 / Glob	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-FL ВПЧ 33,35,56,68	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-FL ВПЧ 51,52,58,66	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
Калибратор К1 ВПЧ 16,18,31 / Glob	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибратор К2 ВПЧ 16,18,31 / Glob	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибратор К1 ВПЧ 39,45,59 / Glob	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибратор К2 ВПЧ 39,45,59 / Glob	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

## ФОРМАТ FRT

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
Калибратор К1 ВПЧ 33,35,56,68	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибратор К2 ВПЧ 33,35,56,68	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибратор К1 ВПЧ 51,52,58,66	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Калибратор К2 ВПЧ 51,52,58,66	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 440 реакций амплификации (всего 110 тестов), включая контроли.

**К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

**К комплекту реагентов прилагается:**

- диск с программным обеспечением в формате Microsoft® Excel для обработки данных и получения результатов.

## 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.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту:

- «ДНК-сорб-АМ» - для экстракции ДНК из соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, взятого для анализа первым, вторым, третьим и четвертым

способом, и соскобов от мужчин.

- «АмплиСенс<sup>®</sup> ДНК-сорб-Д» – для экстракции ДНК из соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, взятого для анализа пятым способом (образцы жидкостной цитологии).
- «ДНК-сорб-С» – для экстракции ДНК из образцов биопсийного материала слизистой шейки матки.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

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

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

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

### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

**Для проведения исследования N биологических образцов в приборе роторного типа:**

- а) в количественном формате** необходимо приготовить следующее количество стрипов (стрипы по четыре пробирки): **X** (равно N биологических образцов) **стрипов** для исследуемых образцов + **3 стрипа** для контрольных образцов (8 пробирок для калибраторов K1, K2 и 4 пробирки для пробы ДНК, экстрагированной из ОКО). Например, для исследования 15 биологических образцов необходимо 18 стрипов.
- б) в качественном формате** необходимо приготовить следующее количество стрипов (стрипы по четыре пробирки): **X** (равно N биологических образцов) **стрипов** для исследуемых образцов + **2 стрипа** для контрольных образцов (4 пробирки для калибраторов K2 и 4 пробирки для пробы ДНК, экстрагированной из ОКО). Например, для исследования 15 биологических образцов необходимо 17 стрипов.

**Для проведения исследования N биологических**

**образцов в приборе планшетного типа:**

- а) **в количественном формате** необходимо приготовить следующее количество стрипов (стрипы по восемь пробирок): **X** (равно 0,5 N биологических образцов, для одного биологического образца требуется 1/2 стрипа, т.е. 4 пробирки) **стрипов** для исследуемых образцов + **1,5 стрипа** для контрольных образцов (8 пробирок для калибраторов K1, K2 и 4 пробирки для пробы ДНК, экстрагированной из ОКО). Например, для исследования 21 биологического образца необходимо 12 стрипов.
- б) **в качественном формате** необходимо приготовить следующее количество стрипов (стрипы по восемь пробирок): **X** (равно 0,5 N биологических образцов, для одного биологического образца требуется 1/2 стрипа, т.е. 4 пробирки) **стрипов** для исследуемых образцов + **1 стрип** для контрольных образцов (4 пробирки для калибраторов K2 и 4 пробирки для пробы ДНК, экстрагированной из ОКО). Например, для исследования 21 биологического образца необходимо 11,5 стрипов.

Подготовить **смесь ПЦР-буфера-В** и **полимеразы (TaqF)**. Для этого содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (60 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-буфером-В (600 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены, промаркировать с указанием даты приготовления.

**ВНИМАНИЕ!** Приготовленная смесь рассчитана на исследование 30 образцов, включая контроли. После приготовления смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

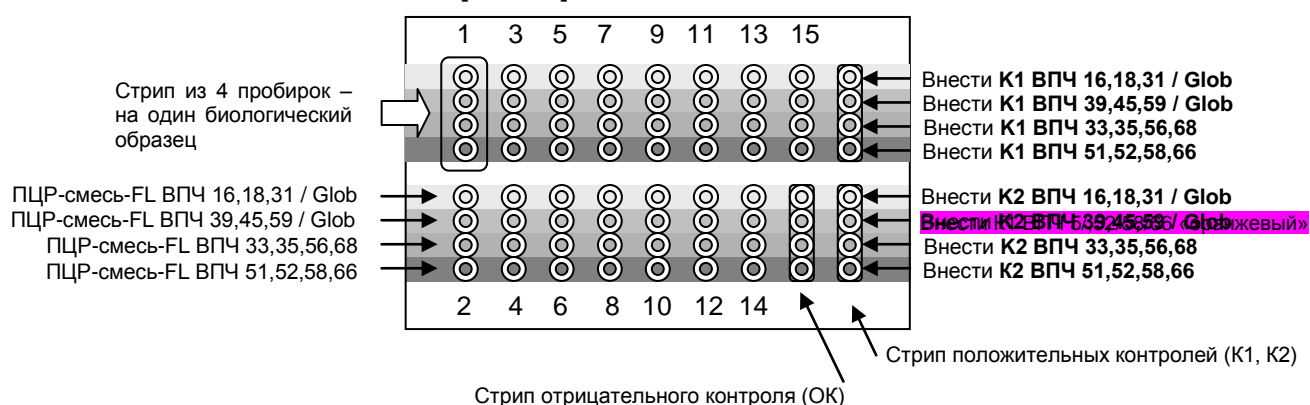
Для каждой из **ПЦР-смесей-FL ВПЧ** смешать реагенты из расчета расходования на одну реакцию: **10 мкл ПЦР-смеси-FL ВПЧ, 5 мкл смеси ПЦР-буфера-В** и **полимеразы (TaqF)**. Для проведения необходимого количества реакций, включая тестирование исследуемых и контрольных образцов (при проведении качественного исследования 2 контрольных образцов – K2 и ОК, при проведении количественного исследования 3 контрольных образцов – K1, K2 и ОК), смешать

в отдельной пробирке реактивы согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1**. Для приготовления реакционной смеси реактивы берутся с запасом на одну реакцию.

**ВНИМАНИЕ!** Смесь полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-В и ПЦР-смесей-FL ВПЧ должны быть использованы в течение 2 ч после приготовления.

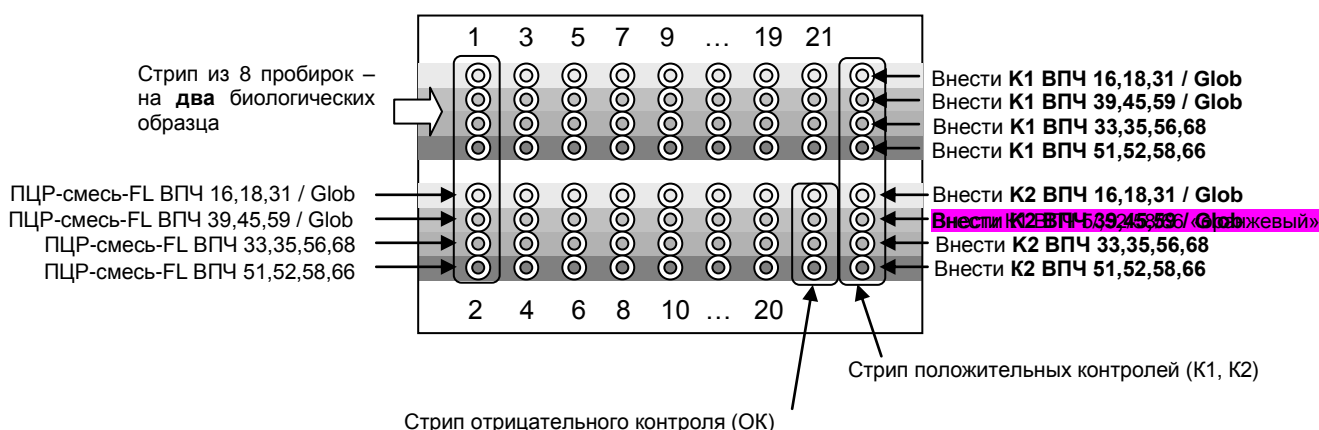
Приготовленные смеси вносятся по **15 мкл** в одну пробирку. Ввиду того, что исследование каждого биологического образца проводится в 4 пробирках с разными смесями, необходимо строго следовать следующим схемам внесения смеси реагентов и биологических образцов:

### Схема внесения смесей и образцов для прибора роторного типа



Пронумерованы ячейки для внесения ДНК, полученной на этапе экстракции из биологических образцов.

### Схема внесения смесей и образцов для прибора планшетного типа



Пронумерованы ячейки для внесения ДНК, полученной на этапе экстракции из биологических образцов.

В первую пробирку каждого стрипа внесите **15 мкл** приготовленной смеси «16,18,31 / Glob», во вторую – **15 мкл** приготовленной смеси «39,45,59 / Glob», в третью – **15 мкл** приготовленной смеси «33,35,56,68», в четвертую – **15 мкл** приготовленной смеси «51,52,58,66». В случае использования стрипа по 8 пробирок, в 5, 6, 7, 8 пробирки смеси вносятся аналогично 1, 2, 3, 4.

**ВНИМАНИЕ!** Для адекватной обработки результатов исследования не меняйте последовательность размещения смесей в стрипе.

Пробы ДНК, полученные в результате экстракции из биологических образцов, вносятся по **10 мкл** образца в каждую из четырех пробирок с различными ПЦР-смесями.

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

#### Внесение контрольных образцов при использовании ротора с 72 лунками

При проведении количественного исследования используются соответствующие калибраторы K1 и K2 для каждого типа смесей. Для этого в пробирки с 65 по 68 внести последовательно по 10 мкл K1 ВПЧ 16,18,31 / Glob, K1 ВПЧ 39,45,59 / Glob; K1 ВПЧ 33,35,56,68 и K1 ВПЧ 51,52,58,66. Также в пробирки с 69 по 72 внести последовательно по 10 мкл K2 ВПЧ 16,18,31 / Glob, K2 ВПЧ 39,45,59 / Glob; K2 ВПЧ 33,35,56,68 и K2 ВПЧ 51,52,58,66.

При проведении качественного исследования для постановки положительных контролей используются калибраторы K2 для каждого типа смесей. Для этого в пробирки с 69 по 72 внести последовательно по 10 мкл K2 ВПЧ 16,18,31 / Glob, K2 ВПЧ 39,45,59 / Glob, K2 ВПЧ 33,35,56,68 и K2 ВПЧ 51,52,58,66.

В четыре пробирки с различными ПЦР смесями (с 61 по 64 для количественного исследования и с 65 по 68 для качественного) внести **10 мкл** пробы ДНК, экстрагированной из ОКО.



**Внесение контрольных образцов в планшет на 96 лунок**

При проведении количественного исследования используются соответствующие калибраторы К1 и К2 для каждого типа смесей. Для этого в пробирки с 89 по 92 внести последовательно по 10 мкл К1 ВПЧ 16,18,31 / Glob; К1 ВПЧ 39,45,59 / Glob; К1 ВПЧ 33,35,56,68 и К1 ВПЧ 51,52,58,66. Также в пробирки с 93 по 96 внести последовательно по 10 мкл К2 ВПЧ 16,18,31 / Glob, К2 ВПЧ 39,45,59 / Glob; К2 ВПЧ 33,35,56,68 и К2 ВПЧ 51,52,58,66.

При проведении качественного исследования для постановки положительных контролей используются калибраторы К2 для каждого типа смесей. Для этого в пробирки с 93 по 96 внести последовательно по 10 мкл К2 ВПЧ 16,18,31 / Glob, К2 ВПЧ 39,45,59 / Glob, К2 ВПЧ 33,35,56,68 и К2 ВПЧ 51,52,58,66.

В четыре пробирки с различными ПЦР смесями (с 85 по 88 для количественного исследования и с 89 по 92 для качественного) внести **10 мкл** пробы ДНК, экстрагированной из ОКО.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «**АмплиСенс-1**» (см. табл. 3).

**Программа «АмплиСенс-1»**

Цикл	Приборы роторного типа <sup>2)</sup>			Приборы планшетного типа <sup>3)</sup>		
	Температура, °С	Время	Кол. циклов	Температура, °С	Время	Кол. 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		60	30 с	
		детекция флуоресц. сигнала				
72	15 с	72	15 с			

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM<sup>4)</sup>, JOE<sup>4)</sup>, ROX<sup>4)</sup>, Cy5<sup>4)</sup>.

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

**АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Расчет и интерпретация полученных результатов осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, приложенного к набору, или рекомендованного ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации

<sup>2)</sup> Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

<sup>3)</sup> Например, iCycler iQ5, iCycler iQ (Bio-Rad, США), Mx3000P, Mx3005P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

<sup>4)</sup> Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

- ДНК ВПЧ ВКР 16,39,33,58 генотипов,
- по каналу для флуорофора JOE (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ ВКР 31,45,35,52 генотипов.
  - по каналу для флуорофора ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ ВКР 18,59,68,66 генотипов
  - по каналу для флуорофора Cy5 (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВПЧ ВКР 56 и 51 генотипа (в пробирках с ПЦР-смесью-FL ВПЧ 33,35,56,68 и 51,52,58,66, соответственно). В пробирках с ПЦР-смесью-FL ВПЧ 16,18,31 / Glob и 39,45,59 / Glob по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал амплификации эндогенного внутреннего контроля – участка  $\beta$ -глобинового гена.

Таблица 4

Матрица сравнения			
FAM	JOE	ROX	Cy5
16	31	18	ВК
39	45	59	ВК
33	35	68	56
58	52	66	51

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

### **При проведении качественного исследования**

Регистрируется наличие соответствующего генотипа ВПЧ ВКР при определении в соответствующей ПЦР-смеси по соответствующему каналу детекции (см. табл. 4) порогового  $C_t$ , не превышающего граничного значения.

Расчет и анализ полученных результатов проводится

автоматически с использованием программного обеспечения в формате Microsoft® Excel «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр».

### **При проведении количественного исследования**

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

Расчет и анализ полученных результатов проводится автоматически с использованием программного обеспечения в формате Microsoft® Excel «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр».

**ВНИМАНИЕ!** Необходимые параметры для расчетов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Полученный результат интерпретируется в соответствии с таблицей 5:

Таблица 5

### **Интерпретация полученных результатов Ig (ВПЧ на 100 тыс клеток)**

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

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 6:**

**Результаты для контролей различных этапов  
ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i> , по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	Значение отсутствует во всех 4-х пробирках	Значение отсутствует во всех 4-х пробирках	Значение отсутствует во всех 4-х пробирках	Значение отсутствует во всех 4-х пробирках
K1, K2	ПЦР	Присутствует значение <i>Ct</i> во всех 4-х пробирках	Присутствует значение <i>Ct</i> во всех 4-х пробирках	Присутствует значение <i>Ct</i> во всех 4-х пробирках	Присутствует значение <i>Ct</i> во всех 4-х пробирках

**Результаты количественного теста не подлежат учету если:**

1. Значение концентрации ДНК человека в пробирке менее  $10^3$  ГЭ/реакция (значение, полученное для образцов по каналу для флуорофора Sy5 в 1 и 2 пробирках образца). Взято недостаточное количество биологического материала или произошел сбой при обработке пробы. Требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Коэффициент корреляции  $R^2$  при построении калибровочной прямой менее 0,9. Требуется перестановка всех проб, начиная с этапа экстракции ДНК.

**ВНИМАНИЕ!**

1. Появление любого значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и/или Sy5 в таблице результатов для отрицательного контроля этапа экстракции (OK) свидетельствует о наличии контаминации реагентов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение *Ct* в таблице результатов для калибраторов ПЦР по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и/или Sy5 отсутствует или превышает граничные значения, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК возбудителя.
3. Если для данного образца не определено значение

порогового цикла  $Ct$  или оно превышает граничное значение по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, ROX, а также Cy5 в пробирках 3 и 4, а по каналу для флуорофора Cy5 в 1 и 2 пробирках получено значение  $Ct$ , превышающее граничное, необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа экстракции. Возможная причина – ошибка в процедуре подготовки биологического материала, приведшая к потере ДНК, или наличие ингибиторов ПЦР.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

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

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

**Хранение.** Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ВПЧ 16,18,31 / Glob, ПЦР-смесь-FL ВПЧ 39,45,59 / Glob, ПЦР-смесь-FL ВПЧ 33,35,56,68, ПЦР-смесь-FL ВПЧ 51,52,58,66 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.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru<sup>5</sup>.

---

<sup>5</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		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Только для исследовательских и иных немедицинских целей		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		



## Приложение 1

### Схема приготовления реакционных смесей для качественного исследования

Число исследуемых биологических образцов	Число исследуемых образцов, включая контроли	ПЦР-смесь-FL	Смесь ПЦР-буфера-В и полимеразы
3	5	60	30
4	6	70	35
5	7	80	40
6	8	90	45
7	9	100	50
8	10	110	55
9	11	120	60
10	12	130	65
11	13	140	70
12	14	150	75
13	15	160	80
14	16	170	85
15	17	180	90
16 <sup>6)</sup>	18 <sup>6)</sup>	190	95
17	19	200	100
18	20	210	105
19	21	220	110
20	22	230	115
21	23	240	120
22 <sup>7)</sup>	24 <sup>7)</sup>	250	125

Примечание – Расчет приведен в соответствии с формулой  $N+3$  для качественного исследования, где  $N$ -количество исследуемых биологических образцов,  $3$  включает все необходимые контроли и запас.

<sup>6)</sup> соответствует полной загрузке прибора роторного типа при качественном исследовании.

<sup>7)</sup> соответствует полной загрузке прибора планшетного типа при качественном исследовании.

## Схема приготовления реакционных смесей для количественного исследования

Число исследуемых биологических образцов	Число исследуемых образцов, включая контроли	ПЦР-смесь-FL	Смесь ПЦР-буфера-В и полимеразы
2	5	60	30
3	6	70	35
4	7	80	40
5	8	90	45
6	9	100	50
7	10	110	55
8	11	120	60
9	12	130	65
10	13	140	70
11	14	150	75
12	15	160	80
13	16	170	85
14	17	180	90
15 <sup>8)</sup>	18 <sup>8)</sup>	190	95
16	19	200	100
17	20	210	105
18	21	220	110
19	22	230	115
20	23	240	120
21 <sup>9)</sup>	24 <sup>9)</sup>	250	125

Примечание – Расчет приведен в соответствии с формулой N+4 для количественного исследования, где N-количество исследуемых биологических образцов, 4 включает все необходимые контроли и запас.

<sup>8)</sup> соответствует полной загрузке прибора роторного типа при количественном исследовании.

<sup>9)</sup> соответствует полной загрузке прибора планшетного типа при количественном исследовании.

### Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
01.11.13 ME	Состав	2 пробирки ПЦР-буфера-В по 1,2 мл заменены на 4 пробирки по 0,6 мл, 2 пробирки полимеразы (TaqF) по 0,12 мл заменены на 4 пробирки по 0,06 мл
13.11.13 GA	Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» А. Подготовка пробирок для амплификации	Объемы пробирок с ПЦР-буфером-В и Полимеразой (TaqF) были заменены на 600 и 60 мкл соответственно; <b>«ВНИМАНИЕ!</b> Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов, включая контроли...» заменено на <b>«ВНИМАНИЕ!</b> Приготовленная смесь рассчитана на исследование 30 образцов, включая контроли...
27.03.14 ME	Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК	В третьем способе взятия биологического материала пробирка на 5 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 2,0 мл заменена на пробирку на 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)» в объеме 0,5 мл
28.01.15 PM	Титульный лист	Для символа <b>RUO</b> добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа <b>RUO</b> изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
04.02.15 PM	Назначение	Удалена фраза: <b>«ВНИМАНИЕ!</b> Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания»
	Титульный лист Символы, используемые в печатной продукции	Для символа <b>RUO</b> изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
12.02.16 ME	Экстракция ДНК из исследуемых образцов	Название комплекта реагентов для экстракции «ДНК-сорб-Д» изменено на «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»
30.05.18 PM	Состав	Уточнен цвет реагентов
14.09.18 EM	Состав	Уточнены цвета реагентов
18.02.19 PM	По тексту	Изменено форматирование текста
23.01.20 MA	Нижний колонтитул	Добавлен новый каталожный номер <b>Формат FRT Форма 2: REF</b> H-3922-1-13-0
17.02.20 MA	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена информация о рекламациях

	Гарантийные обязательства изготовителя	Раздел добавлен
--	--	-----------------