

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Альфалаб»



М.А.Суворова
2018г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления в клиническом материале
ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска
и их дифференциации
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.
«Онко-HPV»

для диагностики in vitro

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ	4
2.1.	ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
2.2.	СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	6
2.3.	ПРИНЦИП МЕТОДА	7
2.4.	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
3.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
4.	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	9
5.	ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	11
6.	ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МАТЕРИАЛА	12
7.	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	13
7.1.	ПЕРВЫЙ ЭТАП - ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ/ОТСУТСТВИЯ ДНК ВПЧ БЕЗ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ТИПА	13
7.1.1.	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ	13
7.1.2.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРВОГО ЭТАПА АМПЛИФИКАЦИИ	14
7.1.3.	АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРВОГО ЭТАПА АМПЛИФИКАЦИИ	15
7.2.	ВТОРОЙ ЭТАП. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ТИПА ВПЧ	16
7.2.1.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА ДЛЯ ФОРМЫ 1 (SCR/ТУР)	16
7.2.1.1.	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ	16
7.2.1.2.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ВТОРОГО ЭТАПА АМПЛИФИКАЦИИ	17
7.2.1.3.	АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ВТОРОГО ЭТАПА АМПЛИФИКАЦИИ	18
7.2.2.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА ДЛЯ ФОРМЫ 3 (ТУР)	19
7.2.2.1.	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ТИПА ВПЧ	19
7.2.2.2.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	20
7.2.2.3.	ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ КАЧЕСТВА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК И КОНТРОЛЯ ВЗЯТИЯ МАТЕРИАЛА	21
7.2.2.4.	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	22
7.2.2.5.	АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	22
8.	УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА	24
9.	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	24

10.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	25
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	26
	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	26

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Онко-HPV» предназначен для качественного обнаружения в образцах биоматериала человека ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска и их дифференциации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Материалом для исследования являются мазки из урогенитального тракта (соскоб эпителия цервикального канала, соскоб эпителия с поверхности шейки матки, соскоб эпителия уретры).

С использованием набора реагентов возможно выявление ДНК ВПЧ, принадлежащих к следующим типам: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73. Перечисленные типы ВПЧ обладают высокой трансформирующей активностью в отношении эпителиальных клеток и могут являться этиологическим фактором развития цервикальных дисплазий и рака шейки матки.

Целевая группа пациентов – женщины и мужчины 25 – 65 лет.

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования. Только для исследований *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.

Набор реагентов выпускается в трёх формах комплектации.

Форма 1 (SCR/TYP) включает:

Реагенты для первого этапа амплификации (скрининг):

- смесь для амплификации «HPV-скрин», запечатанная воском
- раствор Taq-полимеразы «Taq - скрин»
- положительный контрольный образец ПКО-скрин
- отрицательный контрольный образец (ОКО)

Реагенты для второго этапа амплификации (дифференциация типа ВПЧ):

- 12 стрипов по 8 пробирок, содержащих амплификационные смеси для дифференциации типа ВПЧ (специфичность амплификационных смесей согласно рис. 1)
- раствор Taq-полимеразы «Taq -тип»
- комплект положительных контрольных образцов «ПКО-тип», состоящий из восьми положительных контрольных образцов в соответствии с количеством и специфичностью амплификационных смесей для дифференциации типа ВПЧ (ПКО HPV35/18, ПКО HPV16/31, ПКО HPV45/33, ПКО HPV52/56, ПКО HPV59/66, ПКО HPV39/58, ПКО

HPV51/68, ПКО HPV53/73);

- отрицательный контрольный образец (ОКО)

Форма 2 (SCR) включает:

Реагенты для первого этапа амплификации (скрининг):

- смесь для амплификации «HPV-скрин», запечатанная воском
- раствор Taq-полимеразы «Taq - скрин»
- положительный контрольный образец ПКО-скрин
- отрицательный контрольный образец (ОКО)

Форма 3 (TYP) включает:

Реагенты для второго этапа амплификации (дифференциация типа ВПЧ):

- 12 стрипов по 8 пробирок, содержащих амплификационные смеси для дифференциации типа ВПЧ (специфичность амплификационных смесей согласно рис. 1)
- раствор Taq-полимеразы «Taq -тип»
- комплект положительных контрольных образцов «ПКО-тип», состоящий из восьми положительных контрольных образцов в соответствии с количеством и специфичностью амплификационных смесей для дифференциации типа ВПЧ (ПКО HPV35/18, ПКО HPV16/31, ПКО HPV45/33, ПКО HPV52/56, ПКО HPV59/66, ПКО HPV39/58, ПКО HPV51/68, ПКО HPV53/73);
- отрицательный контрольный образец (ОКО)

Реагенты для проверки качества выделения ДНК и взятия биологического материала:

- смесь для амплификации «ВК»
- раствор Taq-полимеразы «Taq - ВК»
- Положительный контрольный образец ПКО-ВК

Форма 1 (SCR/TYP) набора реагентов позволяет выполнить двухэтапное исследование. На первом этапе определяется наличие/отсутствие ДНК ВПЧ одного из следующих типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73; дифференциация типа вируса на данном этапе не проводится. Второй этап исследования необходим только для проб, положительных по результатам проведения первого этапа исследования и осуществляется для определения принадлежности вируса к одному из перечисленных типов.

Количество определений: 50 образцов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы для первого этапа исследования и по 12 образцов для каждого типа ВПЧ при проведении второго этапа исследования, включая положительные и отрицательные контроли.

Форма 2 (SCR) предназначена для проведения первого этапа исследования. Количество определений: 50 образцов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы.

Форма 3 (TYP) предназначена для выполнения второго этапа исследования (дифференциация типа ВПЧ). Количество определений: 12 образцов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы.

Наличие трёх форм комплектации позволяет выбрать формат исследования в соответствии с соображениями клинической и/или экономической целесообразности, в частности:

1. Форма изделия 1 (SCR/TYP) позволяет провести выявление ВПЧ и определение типа ВПЧ с использованием одного набора с единым перечнем типов ВПЧ, определяемых на этапе скрининга и на этапе дифференциации типа, что повышает достоверность анализа;
2. Наличие отдельных форм (Формы 2 (SCR) и Формы 3 (TYP) позволяет оптимизировать исследование с учётом факторов клинической и экономической целесообразности, а именно:
 - использовать Форму изделия 2 (SCR) для проведения скринингового исследования (менее дорогостоящий этап). Доступность скринингового исследования (в том числе, финансовая доступность) актуальна с учётом рисков, связанных с инфицированием ВПЧ высокого онкогенного риска;
 - использовать Форму 3 (TYP) для типирования ВПЧ только для образцов, положительных по результатам скринингового исследования, так как клинически нецелесообразно выполнять типирование ВПЧ пациентам, наличие у которых папилломавирусной инфекции не установлено.

2.2. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Компонент набора	Объем смеси, мкл	Количество пробирок
Реагенты для первого этапа амплификации (скрининг)		
Смесь для амплификации «HPV-скрин»	10	50 пробирок, запечатанных воском
Раствор Таq-полимеразы «Таq - скрин»	150	4 пробирки
Положительный контрольный образец «ПКО-скрин»	100	1 пробирка
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	50	2 пробирки
Реагенты для второго этапа амплификации (дифференциация типа ВПЧ)		
Смеси для амплификации «HPV-тип»	10	12 стрипов по 8 пробирок, запечатанных воском

Раствор Taq-полимеразы «Taq -тип»	250	4 пробирки
Комплект положительных контрольных образцов «ПКО-тип»	20	8 пробирок по 1 пробирке ПКО каждой специфичности
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	50	2 пробирки
Реагенты для проверки качества выделения ДНК и взятия биологического материала		
Смесь для амплификации «ВК»	10	12 пробирок, запечатанных воском
Раствор Taq-полимеразы «Taq - ВК»	130	1 пробирка
Положительный контрольный образец «ПКО-ВК»	30	1 пробирка объемом 0,5 мл

2.3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Для выявления ДНК ВПЧ используется амплификация специфических участков вирусного генома методом ПЦР с применением специфических олигонуклеотидов и меченых олигонуклеотидных зондов Taqman.

В ходе проведения первого этапа амплификации (скрининг) детектируются специфические фрагменты ДНК ВПЧ, принадлежащих к группе папиллом высокого канцерогенного риска (при условии их присутствия в исходном клиническом материале). ПЦР-смесь «HPV-скрин», предназначенная для проведения данного этапа исследования, содержит олигонуклеотиды, специфичные к участкам ДНК вируса папилломы всех определяемых типов, а также олигонуклеотиды, специфичные к участкам гена β -глобина человека, что позволяет одновременно контролировать качество взятия биологического материала и избежать получения ложноотрицательных результатов, обусловленных ошибками на этапе забора материала и выделения ДНК.

При проведении первого и второго этапов амплификации для получения специфических фрагментов ДНК ВПЧ и гена β -глобина человека используются олигонуклеотиды и меченые олигонуклеотидные зонды Taqman. В присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации сопровождается отщеплением флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности) и появлению детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК ВПЧ и детекции фрагмента ДНК человека (внутренний контроль) на этапе скрининга имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную

регистрацию флуоресценции по двум каналам (FAM и HEX). На втором этапе амплификации в каждой из восьми пробирок стрипа объединены две смеси, каждая из которых содержит олигонуклеотиды, специфичные к определенному типу ВПЧ, и зонды, содержащие метку FAM (для одного из типов) и метку HEX (для другого типа).

Набор предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (MiniOpticon, BioRad; ДТ-96 или другие амплификаторы с аналогичными техническими характеристиками).

2.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность. Нижний предел аналитической чувствительности набора реагентов при проведении первого (скрининг) и второго (дифференциация типа ВПЧ) этапов исследования составляет 1000 копий/мл (1000 копий целевой ДНК в пробе, полученной методом экстракции из первичного биологического материала). Указанный уровень аналитической чувствительности обеспечивает детекцию клинически значимого уровня вирусной нагрузки. Пороговой в отношении трансформирующей активности считается концентрация ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска, составляющая 10^5 ГЭ в соскобе или 10^3 ГЭ на 10^5 эпителиальных клеток человека.

Аналитическая специфичность. Специфичность анализа при постановке теста с применением реагентов **первого этапа амплификации** (скрининг) набора «Онко-HPV» подтверждена:

- отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналам FAM и HEX в отрицательных контрольных образцах;
- методом секвенирования продуктов амплификации;
- отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала в образцах, не содержащих ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Специфичность анализа при постановке теста с применением реагентов **второго этапа амплификации** (дифференциация типа ВПЧ) набора «Онко-HPV» подтверждена:

- отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналам FAM и HEX в отрицательных контрольных образцах;
- методом секвенирования продуктов амплификации;
- отсутствием неспецифических перекрестных реакций при тестировании образцов, содержащих ДНК разных типов ВПЧ, включая ВПЧ низкого онкогенного риска.

Диагностическая чувствительность. Набор «Онко-HPV» позволяет выявить ДНК 16-ти генотипов ВПЧ высокого канцерогенного риска. Диагностическая чувствительность **первого этапа амплификации** (скрининг) и **второго этапа амплификации**

(дифференциация типа ВПЧ) определяется на этапе клинических испытаний, количественный расчёт показателей производится по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%.

Диагностическая специфичность. Диагностическая специфичность рассчитывается на основе данных, полученных в ходе клинических испытаний на выборке клинических образцов; расчёт показателя производится по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%.

При проведении первого этапа исследования (скрининг) в 0,5% случаев могут наблюдаться неспецифические перекрестные реакции, обусловленные присутствием в биологическом образце ДНК типов ВПЧ с неустановленной степенью онкогенности (42, 62, 67, 101).

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

3.3. Меры предосторожности - соблюдение правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» 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».

3.4. Утилизация отходов производится в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами", сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Первый этап амплификации - определение наличия/отсутствия ДНК ВПЧ без дифференциации типа (скрининг)

Для постановки ПЦР-реакции необходимы:

- Реагенты для проведения первого этапа амплификации набора реагентов «Онко-HPV»;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;

- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- холодильник для хранения реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09;
- емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- контейнер с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией флуоресценции по двум каналам – FAM и HEX в режиме реального времени.

Второй этап амплификации – дифференциация типа ВПЧ

Выполняется для образцов, положительных по результатам проведения первого этапа амплификации.

Для постановки ПЦР-реакции необходимы:

- Реагенты для проведения второго этапа амплификации набора реагентов «Онко-HPV»;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- холодильник для хранения реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09;
- емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- контейнер с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией флуоресценции по двум каналам – FAM и HEX в режиме «реального времени».

5. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала должно проводиться в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 2012 г.

Материалом для исследования являются:

- соскоб эпителия цервикального канала;
- соскоб эпителия с поверхности шейки матки;
- соскоб эпителия уретры.

ВПЧ имеет внутриклеточную локализацию, поэтому биологический материал, предназначенный для исследования на наличие ДНК ВПЧ, должен содержать достаточное количество эпителиальных клеток.

Материал забирают в пробирку с транспортной средой с помощью урогенитального зонда или цитощётки; рабочую часть цитощётки или зонда погружают в транспортную среду, обламывают и закрывают пробирку. Рекомендуется использование «Реагента для транспортировки и хранения клинического материала «Транспортная среда для мазков» (Интерлабсервис, РУ № ФСР 2009/05515 от 18.11.2011) или «Реагента для транспортировки и хранения клинического материала «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (Интерлабсервис, РУ № ФСР 2009/05514 от 18.11.2011).

Сроки хранения биоматериала в «Транспортной среде для мазков»:

- при комнатной температуре (от 18 до 25°C) до 48 ч;
- при температуре от 2 до 8°C до 7 сут;

Сроки хранения биоматериала в «Транспортной среде с муколитиком (ТСМ)»:

- при комнатной температуре (от 18 до 25°C) до 28 сут;
- при температуре от 2 до 8°C до 3 мес;

При необходимости более длительного хранения пробирки с биоматериалом рекомендуется заморозить при -20°C. Допускается однократное замораживание-оттаивание биоматериала.

Правила забора материала у женщин: для получения соскобного отделяемого цервикального канала (эндоцервикс) и соскоба эпителия наружной поверхности шейки матки (эктоцервикс) используют цитощётку. Допустимо использование универсального гинекологического зонда, однако в этом случае количество эпителиальных клеток может быть недостаточным для проведения скринингового исследования на наличие ВПЧ.

Допускается присутствие в материале небольшого количества цервикальной слизи и крови.

Правила забора материала у мужчин: для получения соскоба с эпителия уретры используют универсальный урогенитальный зонд.

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдение ряда требований:

- взятие клинического материала из цервикального канала проводится вне менструации;
- взятие клинического материала из уретры проводится не ранее чем через три часа после последнего мочеиспускания; при наличии обильных выделений из уретры – через 15 - 20 минут после мочеиспускания;
- материал для повторного исследования с целью контроля эффективности терапии получают не ранее, чем через месяц после первичного исследования.

Перед проведением процедуры экстракции ДНК содержимое пробирки с биоматериалом перемешивают на вортексе и осаждают капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием при 1500-3000 об/мин в течение 5 секунд.

Полученные из образцов биоматериала после процедуры экстракции пробы ДНК хранят при температуре от 2 до 8°C (до 1 недели); более длительное хранение проб ДНК возможно при температуре не выше минус 16°C (до 1 года).

6. ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

ВПЧ имеет внутриклеточную локализацию, поэтому для проведения исследования необходимо использовать образцы биоматериала, содержащие достаточное количество эпителиальных клеток. Значительное содержание в образце примесей в виде цервикальной слизи, крови может приводить к ингибированию реакции амплификации.

Для контроля качества взятия биологического материала и экстракции ДНК в наборе предусмотрена амплификация участка гена β -глобина человека. При использовании Формы комплектации 1 (SCR/TYP) и Формы комплектации 2 (SCR) контроль осуществляется на этапе проведения первого этапа амплификации (скрининг) благодаря наличию в смеси «HPV-скрин» олигонуклеотидов, специфичных к гену β -глобина человека. При использовании Формы комплектации 3 (TYP) предусмотрена постановка отдельной реакции амплификации со смесью «ВК», содержащей олигонуклеотиды, специфичные к гену β -глобина человека.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ образцов включает следующие этапы:

- Пробоподготовка (выделение ДНК из образцов клинического материала).
- Первый этап амплификации - определение наличия/отсутствия ДНК ВПЧ без дифференциации типа (скрининг).
- Второй этап амплификации – дифференциация типа ВПЧ (необходим для образцов, для которых получен положительный результат при проведении первого этапа амплификации).

ВНИМАНИЕ! Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала не входит в состав набора

Для выделения ДНК из клинических образцов рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ», зарегистрированный в РЗН РФ и предназначенный для применения в клинической лабораторной диагностике при анализе мазков из урогенитального тракта. Экстракцию ДНК проводят согласно инструкции производителя набора.

Не рекомендуется использование экспресс-методов выделения ДНК, так как это может приводить к значительному снижению диагностической чувствительности набора и получению ложноотрицательных результатов.

7.1. Первый этап - определение наличия/отсутствия ДНК ВПЧ без дифференциации типа.

7.1.1. ПЦР-амплификация

! Важно: Общий объем пробы ДНК, выделенной из анализируемого клинического образца, достаточный для проведения первого и второго этапа исследования - не менее 50 мкл.

На первом этапе исследования анализ образца предполагает постановку одной реакции – с использованием смеси «HPV-скрин» и раствора Таq-полимеразы «Таq-скрин».

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.

Проведение исследования:

1. В штатив поставить:

- пробирки со смесью для амплификации «HPV-скрин» из расчета: одна пробирка – для каждого анализируемого образца, и по одной пробирке для положительного и отрицательного контролей);

2. В каждую пробирку, не повреждая слой воска, внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы «Taq-скрин»;
3. Закрыть крышки пробирок;
4. В пробирку со смесью для амплификации, подготовленную для отрицательного контроля, внести 5 мкл ОКО;
5. В пробирки со смесью для амплификации, подготовленные для анализируемых образцов, внести поочередно по 5 мкл исследуемого образца;
6. В пробирки со смесями для амплификации, подготовленные для положительного контроля, внести 5 мкл ПКО-скрин;
7. Установить все пробирки в блок детектирующего амплификатора;
8. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 1.

Внимание! Для предотвращения контаминации при внесении в пробирки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

Таблица 1. Каналы детекции продуктов амплификации и программа амплификации

Специфический продукт		FAM
Внутренний контроль		HEX

Температура	Время	Количество циклов
95°C	15 мин	1
95°C	12 сек	5
45°C	30 сек	
60°C	60 сек	
95°C	12 сек	40
45°C	30 сек *	
60°C	60 сек	
10°C - хранение		

* - детекция флуоресцентного сигнала

7.1.2. Регистрация результатов первого этапа амплификации

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору.

- по каналу FAM регистрируется сигнал о накоплении специфического продукта амплификации – фрагмента ДНК одного или нескольких типов ВПЧ;

- по каналу HEX регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента гена β-глобина человека (используется в качестве контроля взятия материала).

7.1.3. Анализ и интерпретация результатов первого этапа амплификации

Учет результатов следует начинать с результатов амплификации положительных и отрицательных контрольных образцов.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t .

Принцип интерпретации:

Результаты анализа не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM в пробирке с положительным контрольным образцом (ПКО-скрин). **В данной ситуации необходимо повторное исследование образцов.**
- В пробирке с анализируемым образцом при проведении амплификации не регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу HEX или величина порогового цикла C_t превышает 35. **Для такого образца процедура исследования должна быть проведена повторно, начиная со стадии выделения ДНК. При повторении результата делается вывод о плохом качестве взятия клинического материала, образец должен быть взят повторно.**
- В пробирке с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM и/или каналу HEX. **Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.**

Результаты анализа учитываются, если

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX в пробирке с ПКО-скрин;
- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM и HEX в пробирке с отрицательным контрольным образцом;

При соблюдении этих условий анализируемая проба считается положительной, если:

- для пробы определены значения порогового цикла C_t по каналам FAM и HEX;
- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- кривая флуоресценции по каналам FAM и HEX пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

Получение положительного результата является основанием для заключения о наличии в анализируемом клиническом образце ДНК одного или нескольких типов ВПЧ высокого онкогенного риска.

Анализируемая проба считается отрицательной, если:

- во время прохождения амплификации регистрируется флуоресцентный сигнал по каналу HEX;
- во время прохождения амплификации **отсутствует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM.

Получение отрицательного результата является основанием для заключения об отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска.

7.2. Второй этап. Дифференциация типа ВПЧ.

7.2.1. Последовательность проведения анализа для Формы 1 (SCR/TYP)

7.2.1.1. ПЦР-амплификация

Второй этап исследования проводится **только** для проб, положительных по результатам проведения первого этапа исследования и осуществляется для определения принадлежности вируса к одному из следующих типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73. Анализ образца проводится в соответствии со схемой, приведенной в Таблице 2.

Таблица 2. Схема расположения амплификационных смесей в стрипе и наименование канала для детекции флуоресцентного сигнала

	FAM	HEX	Используемый ПКО
Окрашенная смесь	«HPV-35»	«HPV-18»	ПКО 35/18
Прозрачная смесь	«HPV-16»	«HPV-31»	ПКО 16/31
Прозрачная смесь	«HPV-45»	«HPV-33»	ПКО 45/33
Прозрачная смесь	«HPV-52»	«HPV-56»	ПКО 52/56
Прозрачная смесь	«HPV-59»	«HPV-66»	ПКО 59/66
Прозрачная смесь	«HPV-39»	«HPV-58»	ПКО 39/58
Прозрачная смесь	«HPV-51»	«HPV-68»	ПКО 51/68
Прозрачная смесь	«HPV-53»	«HPV-73»	ПКО 53/73

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.

Для проведения данного этапа исследования необходимо, чтобы общий объем ДНК, выделенной из анализируемого образца, составлял не менее 45 мкл (по 5 мкл на 8 реакций)

На втором этапе исследования анализ образца предполагает использование смесей «HPV-тип» и раствора Таq-полимеразы «Таq-тип».

Проведение исследования:

1. В штатив поставить необходимое количество стрипов со смесями для амплификации из расчёта $n + 2$, где n – количество анализируемых образцов, два дополнительных стрипа предназначены для анализа положительных и отрицательных контрольных образцов.

2. Во все пробирки каждого стрипа внести, не повреждая слой воска, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы «Taq-тип»;
3. Закрыть крышки пробирок;
4. В каждую пробирку стрипа, предназначенного для отрицательного контроля, внести поочередно по 5 мкл ОКО;
5. В каждую пробирку стрипа, подготовленного для исследуемого образца, внести поочередно по 5 мкл соответствующей пробы ДНК;
6. Повторить процедуру для всех исследуемых образцов; **! Важно: для недопущения контаминации при внесении ДНК следует открывать крышки пробирок только того стрипа, в который будет вноситься образец, и закрывать их перед внесением следующего образца.**
7. В каждую пробирку стрипа, предназначенного для положительных контрольных образцов, внести поочередно по 5 мкл соответствующего ПКО согласно Таблице 2;
8. Установить все стрипы в блок детектирующего амплификатора;
9. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в Таблице 3.

Внимание! Для предотвращения контаминации при внесении в пробирки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

Таблица 3. Условия проведения ПЦР на втором этапе амплификации (дифференциация типа ВПЧ)

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
95°C	15 мин	1
94°C	30 сек	5
58°C	45 сек	
72°C	10 сек	
94°C	20 сек	40
58°C	30 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		

*

- детекция флуоресцентного сигнала

7.2.1.2. Регистрация результатов второго этапа амплификации.

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору. Сигнал о накоплении специфических продуктов амплификации – фрагментов ДНК отдельных типов ВПЧ - регистрируется по каналу **FAM** и/или **HEX** (в соответствии с Таблицей 2).

7.2.1.3. Анализ и интерпретация результатов второго этапа амплификации.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t .

Учет результатов следует начинать с результатов амплификации положительных и отрицательных контрольных образцов.

Принцип интерпретации:

Результаты анализа не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX (либо по одному из каналов) в одной или нескольких пробирках с ПКО; **в данной ситуации необходимо повторение исследования;**
- В пробирках стрипа с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX (либо по одному из каналов). **Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.**

Результаты анализа учитываются, если

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX во всех пробирках стрипа с ПКО;
- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM и HEX в пробирках стрипа с ОКО;

Заключение о наличии либо отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК определенного типа/типов ВПЧ делается в соответствии с Таблицей 2.

Тип ВПЧ для анализируемой пробы определён, если:

- как минимум в одной из пробирок стрипа, содержащего исследуемый образец, регистрируется флуоресцентный сигнал по каналу FAM и/или HEX;
- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение порогового цикла C_t ;
- кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

7.2.2. Последовательность проведения анализа для Формы 3 (ТУР)

Данная форма комплектации не включает реагенты для первого этапа амплификации (скрининг), в процессе которого параллельно с накоплением фрагментов ДНК ВПЧ происходит накопление продуктов амплификации фрагмента гена β -глобина человека.

Проверка качества выделения ДНК и взятия биологического материала должна осуществляться отдельно с использованием предназначенных для этого реагентов, входящих в состав набора данной формы комплектации.

7.2.2.1. ПЦР-амплификация для дифференциации типа ВПЧ

Исследование осуществляется для определения принадлежности вируса к одному из следующих типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73.

Анализ образца проводится в соответствии со схемой, приведенной в Таблице 4 и предполагает использование смесей «HPV-тип» и раствора Taq-полимеразы «Taq-тип».

Таблица 4. Схема расположения амплификационных смесей в стрипе и наименование канала для детекции флуоресцентного сигнала

	FAM	HEX	Используемый ПКО
Окрашенная смесь	«HPV-35»	«HPV-18»	ПКО 35/18
Прозрачная смесь	«HPV-16»	«HPV-31»	ПКО 16/31
Прозрачная смесь	«HPV-45»	«HPV-33»	ПКО 45/33
Прозрачная смесь	«HPV-52»	«HPV-56»	ПКО 52/56
Прозрачная смесь	«HPV-59»	«HPV-66»	ПКО 59/66
Прозрачная смесь	«HPV-39»	«HPV-58»	ПКО 39/58
Прозрачная смесь	«HPV-51»	«HPV-68»	ПКО 51/68
Прозрачная смесь	«HPV-53»	«HPV-73»	ПКО 53/73

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.

Для проведения исследования необходимо, чтобы общий объем ДНК, выделенной из анализируемого образца, составлял не менее 50 мкл (по 5 мкл на 8 реакций для дифференциации типа ВПЧ и 5 мкл для проверки качества выделения ДНК)

Проведение исследования:

1. В штатив поставить необходимое количество стрипов со смесями для амплификации из расчета $n + 2$, где n – количество анализируемых образцов, два дополнительных стрипа предназначены для анализа положительных и отрицательных контрольных образцов.

2. Во все пробирки каждого стрипа внести, не повреждая слой воска, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы «Taq-тип»;
3. Закрыть крышки пробирок;
10. В каждую пробирку стрипа, предназначенного для отрицательного контроля, внести поочередно по 5 мкл ОКО;
11. В каждую пробирку стрипа, подготовленного для исследуемого образца, внести поочередно по 5 мкл соответствующей пробы ДНК;
12. Повторить процедуру для всех исследуемых образцов; **! Важно: для недопущения контаминации при внесении ДНК следует открывать крышки пробирок только того стрипа, в который будет вноситься образец, и закрывать их перед внесением следующего образца.**
13. В каждую пробирку стрипа, предназначенного для положительных контрольных образцов, внести поочередно по 5 мкл соответствующего ПКО согласно Таблице 2;
14. Установить все стрипы в блок детектирующего амплификатора;
15. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в Таблице 5.

Внимание! Для предотвращения контаминации при внесении в пробирки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

Таблица 5. Условия проведения ПЦР на втором этапе амплификации (дифференциация типа ВПЧ)

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
95°C	15 мин	1
94°C	30 сек	5
58°C	45 сек	
72°C	10 сек	
94°C	20 сек	40
58°C	30 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		

* - детекция флуоресцентного сигнала

7.2.2.2. Регистрация результатов амплификации.

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору.

Сигнал о накоплении специфических продуктов амплификации – фрагментов ДНК отдельных типов ВПЧ - регистрируется по каналу FAM и/или HEX (в соответствии с Таблицей 4).

7.2.2.3. ПЦР-амплификация для проверки качества выделения ДНК и контроля взятия материала.

Проведение исследования:

1. В штатив поставить необходимое количество пробирок, содержащих смесь для амплификации «ВК», из расчёта $n + 2$, где n – количество анализируемых образцов, две дополнительных пробирки предназначены для анализа положительных и отрицательных контрольных образцов.
2. Во все пробирки внести, не повреждая слой воска, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы «Таq-ВК»;
3. Закрыть крышки пробирок;
16. В пробирку, предназначенную для отрицательного контроля, внести 5 мкл ОКО;
17. В пробирку, подготовленную для исследуемого образца, внести 5 мкл соответствующей пробы ДНК;
18. Повторить процедуру для всех исследуемых образцов; **! Важно:** для недопущения контаминации при внесении ДНК следует открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься образец, и закрывать её перед внесением следующего образца.
19. В пробирку, предназначенную для положительного контрольного образца, внести 5 мкл ПКО-ВК.
20. Установить все пробирки в блок детектирующего амплификатора;
21. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в Таблице 6.

Внимание! Для предотвращения контаминации при внесении в пробирки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

Таблица 6. Условия проведения ПЦР со смесью для амплификации ВК для проверки качества выделения ДНК и взятия биологического материала

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
95°C	15 мин	1
94°C	30 сек	40
58°C	30 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		

* - детекция флуоресцентного сигнала

7.2.2.4. Регистрация результатов амплификации.

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору. Сигнал о накоплении продуктов амплификации – фрагментов ДНК гена β -глобина человека регистрируется по каналу HEX.

7.2.2.5. Анализ и интерпретация результатов.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t .

Учет результатов при проведении ПЦР-амплификации для дифференциации типа ВПЧ и при проведении ПЦР-амплификации для проверки качества выделения ДНК и контроля взятия материала следует начинать с результатов амплификации положительных и отрицательных контрольных образцов.

Принцип интерпретации:

Результаты дифференциации типа ВПЧ не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX (либо по одному из каналов) в одной или нескольких пробирках с ПКО-тип; **в данной ситуации необходимо повторение исследования;**
- В пробирках стрипа с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX (либо по одному из каналов). **Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.**

Результаты проверки качества выделения ДНК и контроля взятия материала не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу HEX в пробирке с ПКО-ВК; **в данной ситуации необходимо повторение исследования;**
- В пробирке с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу HEX. **Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов;**

- В пробирке с анализируемым образцом при проведении амплификации не регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу HEX или величина порогового цикла C_t превышает 35. Для такого образца процедура исследования должна быть проведена повторно, начиная со стадии выделения ДНК. При повторении результата делается вывод о плохом качестве взятия клинического материала, образец должен быть взят повторно.

Результаты дифференциации типа ВПЧ учитываются, если:

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX во всех пробирках стрипа с ПКО-тип;
- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM и HEX в пробирках стрипа с ОКО;

Результаты проверки качества выделения ДНК и контроля взятия материала учитываются, если:

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу HEX в пробирке с ПКО-ВК;
- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналу HEX в пробирках стрипа с ОКО, или при наличии флуоресцентного сигнала значение порогового цикла C_t более 35;
- В пробирках с анализируемыми образцами при проведении амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу HEX, и величина порогового цикла C_t не превышает 35.

Заключение о наличии либо отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК определенного типа/типов ВПЧ делается в соответствии с Таблицей 4.

Тип ВПЧ для анализируемой пробы определён, если:

- как минимум в одной из пробирок стрипа со смесями «HPV-тип», содержащего исследуемый образец, регистрируется флуоресцентный сигнал по каналу FAM и/или HEX;
- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение порогового цикла C_t ;
- кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.
- в пробирке со смесью «ВК», содержащей исследуемый образец, регистрируется флуоресцентный сигнал по каналу HEX и значение порогового цикла C_t не превышает 35.

Анализируемая проба считается отрицательной, если:

- во время прохождения амплификации со смесью «ВК» в пробирке, содержащей исследуемый образец, регистрируется флуоресцентный сигнал по каналу HEX и значение порогового цикла C_t не превышает 35;
- во время прохождения амплификации со смесями «HPV-тип» во всех пробирках стрипа, содержащего исследуемый образец, **отсутствует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX.

Получение отрицательного результата является основанием для заключения об отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска.

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

- 8.1. Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.
- 8.2. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.
- 8.3. Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.
- 8.4. Условия хранения отдельных компонентов набора «Онко-HPV» указаны на упаковке. Пробирки и стрипы со смесями для амплификации необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °C. Раствор полимеразы необходимо хранить при температуре от 2 до 8 °C.
- 8.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

9. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 9.1. Наборы, потерявшие свои потребительские качества в результате ненадлежащего хранения, а также наборы и их компоненты с истекшим сроком годности подлежат утилизации в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).
- 9.2. Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

10. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

10.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

10.2. По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб», Санкт Петербург, ул. Академика Павлова 14а, info@alphalabs.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ПЦР- полимеразная цепная реакция

ВПЧ – вирус папилломы человека

HPV – human papilloma virus (вирус папилломы человека)

ПКО- положительный контрольный образец

ОКО- отрицательный контрольный образец

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ:



Номер серии



Только для in vitro диагностики



Дата изготовления



Срок годности



Хранить при температуре



Беречь от солнечных лучей

Прошито и пронумеровано 26
В количестве _____ листов

Генеральный директор ООО «Альфалаб»
Суворова М.А.

