КОПИЯ ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

_____ А.В. Ходяков

12.04.2022

# НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО И НИЗКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH HPV GT (R))

Краткое руководство версии 12.04.22

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по науке ООО «Амплитек»

_____ А.С. Коновалов

12.04.2022

Руководитель отдела разработки документации ООО «Амплитек»

_____ Д.А. Бурдачёва

12.04.2022

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ООО «Амплитек»,
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.amplitech.ru.

АМПЛИТЕК

# Amplitech HPV GT (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения и генотипирования ДНК вирусов папилломы человека высокого и низкого канцерогенного риска методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech HPV GT (R))

## КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD REF P005-0 LOT xxxx Σ 96

**ВНИМАНИЕ!** Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения и генотипирования ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов) и низкого (6, 11 типов) канцерогенного риска в биологическом материале человека, полученном в рамках профилактического ВПЧ-скрининга, диспансерного мониторинга пациентов с ВПЧ-инфекцией, диагностики ВПЧ-инфекции при онкопатологии шейки матки и при воспалительных заболеваниях мочеполовой системы у женщин и мужчин. Определение и генотипирование ДНК ВПЧ с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

### Область применения

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* ВПЧ-инфекции, вызываемой 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типами ВПЧ (выявление, количественное определение и генотипирование ДНК ВПЧ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов).

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях и научно-исследовательских организациях.

## ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

- Мазки со слизистой оболочки влагалища, соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса), помещённые в транспортную среду, не предназначенную для жидкостной цитологии;
- Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса), помещённые в среду для жидкостной цитологии.

## РЕАГЕНТЫ

| Реагент | Внешний вид | Меры предосторожности |
|---|---|---|
| Смесь HPV GT (R)-1 | Гель от светло-розового до красного цвета на дне пробирок | Реагенты содержат азид натрия в концентрации не более 0,05 % веществ, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии. |
| Смесь HPV GT (R)-2 | Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок | |
| Смесь HPV GT (R)-3 | | |
| Смесь HPV GT (R)-4 | | |
| ОК | Прозрачная бесцветная жидкость | |
| ПК HPV | | |



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК, ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР И ДЕТЕКЦИИ

### Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

Экстракцию ДНК и внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки с реакционными Смесями HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3 и HPV GT (R)-4 провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «ДНК-ВПЧ (R)» (ООО «Амплитек»).

**ВНИМАНИЕ!** Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ОК и ПК HPV и осадить капли на вортексе.

2 Подготовить картридж с реагентами из набора «ДНК-ВПЧ (R)» и внести в него исследуемые образцы[1] и контроли согласно инструкции по его применению.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК HPV не менее чем в одном повторе.

3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «ДНК-ВПЧ (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.

4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесями HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3 и HPV GT (R)-4, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

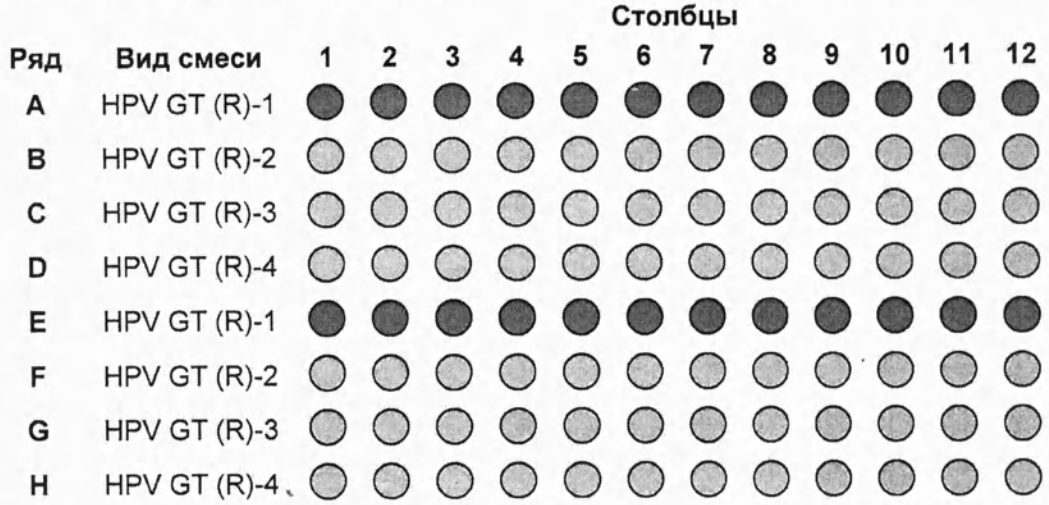


Рисунок 1 - Схема планшета с реагентами

5 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

6 Установить отрезанные пробирки со Смесями на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

7 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «ДНК-ВПЧ (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции, равный 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного ниже.

[1] Для соскобов эпителия в транспортной среде для жидкостной цитологии необходимо провести предобработку согласно инструкции по применению набора для проведения экстракции.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech HPV GT (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

9 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 2 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 5 с | – | 42 |
| | 60 | 20 с | FAM, R6G[2], ROX, Cy5, Cy5.5 | |

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
2) При одновременном поведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.

10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

**Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции**

1 Провести экстракцию ДНК (с применением автоматической или ручной методики) с использованием набора реагентов «ДНК-ВПЧ (R)» (ООО «Амплитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объёме 100 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК HPV не менее чем в одном повторе. Перед использованием контролей перемешать их и осадить капли на вортексе.

2 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесями HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3 и HPV GT (R)-4, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

3 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

4 Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.

5 Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК HPV).

**ВНИМАНИЕ!** Каждый образец ДНК вносится в четыре пробирки с разными реакционными Смесями, т.е. для каждого образца по одной пробирке с каждым видом Смеси (HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3, HPV GT (R)-4).

**ВНИМАНИЕ!** При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.

7 После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech HPV GT (R)».

8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 5 с | – | 42 |
| | 60 | 20 с | FAM, R6G[2], ROX, Cy5, Cy5.5 | |

[2] Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
2) При одновременном поведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.

9 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

## УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ. ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1 Рассчитать концентрацию ДНК человека для исследуемых образцов отдельно для каждого вида Смеси согласно формуле (1).

$$C_ч = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (1)$$

где $C_ч$ – концентрация ДНК человека, копий/мл;
ΔCt – разность между значением порогового цикла (Ct) для исследуемого образца и значением Ct для ПК HPV по каналу Cy5.5.

2 Если концентрация ДНК человека для исследуемого образца для любой из Смесей получена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует, образцу присваивается результат «Невалидный».

3 При получении валидного результата для исследуемого образца проверить наличие значения Ct для каждого вида Смеси по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5.

4 Если значения Ct по всем каналам FAM, HEX, ROX, Cy5 для всех Смесей отсутствуют, образцу присваивается результат «ДНК ВПЧ не обнаружена».

5 При наличии значения/значений Ct по каналам FAM/HEX/ROX/Cy5 для любой из Смесей определить выявленный тип/типы ВПЧ с использованием таблицы, указанной ниже. Выявленный тип определяется на пересечении наименования канала, для которого были получено значение Ct, и наименования Смеси.

| Смесь | Канал детекции сигнала от флуорофора | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | FAM | R6G[2] | ROX | Cy5 | Cy5.5 |
| Смесь HPV GT (R)-1 | 16 генотип | 18 генотип | 45 генотип | 31 генотип | ВК |
| Смесь HPV GT (R)-2 | 35 генотип | 33 генотип | 39 генотип | 51 генотип | ВК |
| Смесь HPV GT (R)-3 | 52 генотип | 58 генотип | 56 генотип | 59 генотип | ВК |
| Смесь HPV GT (R)-4 | 66 генотип | 68 генотип | 11 генотип | 6 генотип | ВК |

6 Рассчитать концентрацию ДНК выявленного типа/типов ВПЧ согласно формуле (2).

$$C_{HPV} = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (2)$$

где $C_{HPV}$ – концентрация ДНК ВПЧ, копий/мл;
ΔCt – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК HPV по каналу FAM/HEX/ROX/Cy5[3].

7 Рассчитать вирусную нагрузку в копиях ДНК ВПЧ на $10^5$ клеток человека для выявленного типа/типов ВПЧ согласно формуле (3).

$$VL = \frac{C_{HPV}}{C_ч} \cdot 100000 \quad (3)$$

где VL – вирусная нагрузка ДНК ВПЧ, копий/$10^5$ клеток человека;
$C_{HPV}$ – концентрация ДНК ВПЧ, копий/мл;
$C_ч$ – концентрация ДНК человека, копий/мл.

8 Рассчитать суммарную вирусную нагрузку[4] в lg копий ДНК ВПЧ ВКР на $10^5$ клеток человека для выявленного типа/типов ВПЧ ВКР согласно формуле (4).

[3] Канал детекции и Смесь для ПК HPV должны соответствовать каналу и Смеси для исследуемого образца. Расчёт производится отдельно по каждому из каналов.
[4] Суммарная вирусная нагрузка не включает концентрации ДНК ВПЧ 6 и 11 типов.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

$$VL_{сум} = \lg \Sigma C_{HPV} \quad (4)$$

где $VL_{сум}$ – суммарная вирусная нагрузка ДНК ВПЧ ВКР, lg копий/$10^5$ клеток человека;

$\lg \Sigma C_{HPV}$ – сумма концентраций выявленных типов ДНК ВПЧ ВКР, копий/$10^5$ клеток человека.

9 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблицам, приведённым ниже.

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов**

| Результат | Описание |
|---|---|
| ДНК ВПЧ не выявлена | ДНК ВПЧ выявляемых типов в исследуемом образце не выявлена. |
| Выявлена ДНК ВПЧ в концентрации lg X копий ДНК ВПЧ/$10^5$ клеток человека, У типа | Исследуемый образец содержит ДНК ВПЧ определённого типа в указанной концентрации. |
| Невалидный | Концентрация ДНК человека (ВК) в исследуемом образце недостаточна для анализа. |

**Интерпретация значений суммарной вирусной нагрузки для исследуемых образцов при выявлении ДНК ВПЧ ВКР**

| Суммарная вирусная нагрузка, lg копий ДНК ВПЧ ВКР/$10^5$ клеток человека | Интерпретация |
|---|---|
| Менее 3 | Клинически малозначимая величина |
| От 3 до 5 | Клинически значимая величина. Существует риск дисплазии. |
| Более 5 | Клинически значимая величина. Высокая вероятность дисплазии. |

10 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей, приведённой ниже.

| Контроль | Норма |
|---|---|
| ОК | По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct отсутствует или определено не меньше 41. |
| ПК | По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct определено не больше 38. |

11 Рекомендации по устранению возможных ошибок в процессе проведения исследования указаны в таблице, приведённой ниже.

| Ошибка | Возможная причина возникновения | Рекомендации по устранению |
|---|---|---|
| Для ПК значение Ct каналу FAM и/или HEX и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 отсутствует или определено больше 38. | Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР. | Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК. |
| Для ОК по каналу FAM и/или HEX и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение Ct меньше 41. | Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации. | Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК. |
| Для исследуемого образца концентрация ДНК человека для любой из Смесей получена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует. | Нарушения при взятии и/или хранении биоматериала.<br>Некорректное проведение экстракции ДНК.<br>Наличие в образце ингибиторов ПЦР. | Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала. |



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## Лист регистрации изменений

| Изм. | Номера страниц | | | | Всего страниц в документе | Номер документа | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | измененных | замененных | новых | аннулированных | | | | |
| 1 | – | 1-5 | – | – | – | 19926214.022315-22 | | 12.04.22 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, скреплено и прошито

7

лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Амплитек»

_____А.В. Ходяков

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

_____ А.В. Ходяков

28.04.2022

# НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО И НИЗКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH HPV GT (R))

Инструкция по применению версии 28.04.22

Лист утверждения

Заместитель генерального директора по науке ООО «Амплитек»

_____ А.С. Коновалов

28.04.2022

Руководитель отдела разработки документации ООО «Амплитек»

_____ Д.А. Бурдачёва

28.04.2022

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

АМПЛИТЕК

# Amplitech HPV GT (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения и генотипирования ДНК вирусов папилломы человека высокого и низкого канцерогенного риска методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech HPV GT (R))

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

REF P005-0

Σ 24

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## СОДЕРЖАНИЕ


ВВЕДЕНИЕ ... 3
1 НАЗНАЧЕНИЕ ... 4
1.1 Область применения ... 4
2 СОСТАВ ... 4
3 ПРИНЦИП МЕТОДА ... 5
3.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК HPV ... 5
4 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ ... 6
5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ... 6
6 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ ... 8
7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ... 9
7.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции ... 9
7.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции ... 11
8 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ... 12
9 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ... 14
10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ... 14
10.1 Контроли, используемые в процессе исследования ... 14
10.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации ... 15
10.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований ... 15
11 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА ... 15
11.1 Предел обнаружения, диапазон измерения и предел измерения ... 15
11.2 Аналитическая специфичность ... 15
11.3 Прецизионность измерения ... 17
11.4 Правильность измерения ... 17
11.5 Диагностические характеристики ... 17
11.6 Корреляция ... 18
12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА ... 18
12.1 Срок годности ... 18
12.2 Хранение ... 18
12.3 Транспортирование ... 19
12.4 Эксплуатация ... 19
13 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ ... 19
14 БИБЛИОГРАФИЯ ... 19
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ ... 19
16 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ ... 21
17 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА ... 21
18 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ ... 21





ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 28.04.22 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного и количественного определения и генотипирования ДНК вирусов папилломы человека высокого и низкого канцерогенного риска методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech HPV GT (R))» по ТУ 21.20.23-009-19926214-2021 (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech HPV GT (R).

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

2. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) представляют собой группу из более чем 100 близкородственных безоболочечных двухцепочечных ДНК-вирусов семейства Papillomaviridae. ВПЧ инфицируют эпителиальные клетки кожи и слизистых оболочек. Не менее 35 типов ВПЧ поражают слизистую оболочку половых органов человека, что может вызывать доброкачественную пролиферацию тканей и/или неопластическую трансформацию эпителия с последующим развитием рака. По способности вызывать злокачественное перерождение эпителия, можно выделить две группы ВПЧ – «ВПЧ низкого канцерогенного риска» и «ВПЧ высокого канцерогенного риска» (ВПЧ ВКР).

К ВПЧ ВКР относятся 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типы. ВПЧ ВКР являются главной этиологической причиной развития рака шейки матки и предшествующей ему тяжелой дисплазии. Суммарно 14 типов ВПЧ ВКР обнаруживаются в 95 % случаев рака шейки матки.

К ВПЧ низкого канцерогенного риска относятся 6, 11, 36, 42, 43, 44, 46, 47 и 50 типы. ВПЧ низкого онкогенного риска ассоциированы с доброкачественной пролиферации кожи и слизистых в виде генитальных и венерических бородавок, остроконечных и экзофитных кондилом. Выявление 6 и 11 генотипов ВПЧ является достаточным для диагностики, так как с ними сопряжено более 90% клинических форм низкоонкогенной папилломавирусной инфекции.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения и генотипирования ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов) и низкого (6, 11 типов) канцерогенного риска в биологическом материале человека, полученном в рамках профилактического ВПЧ-скрининга, диспансерного мониторинга пациентов с ВПЧ-инфекцией, диагностики ВПЧ-инфекции при онкопатологии шейки матки и при воспалительных заболеваниях мочеполовой системы у женщин и мужчин. Определение и генотипирование ДНК ВПЧ с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из:

- соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса) и мазков со слизистой оболочки влагалища, помещённых в транспортную среду, не предназначенную для жидкостной цитологии,
- соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса), помещённых в среду для жидкостной цитологии.

### 1.1 Область применения

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* ВПЧ-инфекции, вызываемой 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типами ВПЧ (выявление, количественное определение и генотипирование ДНК ВПЧ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов).

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях и научно-исследовательских организациях.

## 2 СОСТАВ

Состав набора[1] указан в таблице 1 и 2.

Таблица 1

**Состав набора**

| Компонент | Номинальный объём, мл | Кол-во | Внешний вид |
|---|---|---|---|
| Планшет с реагентами HPV GT (R) | – | 1 шт. | 96-луночный делимый планшет с реагентами, заклеенный защитной плёнкой |
| Плёнки для планшета | – | 2 шт. | Клейкие плёнки |
| ОК (Буферный раствор) | 0,8 | 1 пробирка | Прозрачная бесцветная жидкость |
| ПК HPV (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых типов ВПЧ) | 0,8 | 1 пробирка | Прозрачная бесцветная жидкость |
| Инструкция по применению | – | 1 шт. | В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/ |
| Краткое руководство | – | 1 шт. | В бумажном виде |

[1] Набор упакован в коробку из картона.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

| Компонент | Номинальный объём, мл | Кол-во | Внешний вид |
|---|---|---|---|
| Паспорт | – | 1 шт. | В электронном виде[2] по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/ |

Таблица 2

**Расположение реагентов в планшете**

| Ряды пробирок | Реагент | Внешний вид |
|---|---|---|
| A, E | Смесь HPV GT (R)-1 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями) | Гель от светло-розового до красного цвета на дне пробирок |
| B, F | Смесь HPV GT (R)-2 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями) | Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок |
| C, G | Смесь HPV GT (R)-3 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями) | Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок |
| D, H | Смесь HPV GT (R)-4 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями) | Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок |

Набор рассчитан на проведение исследования 24 образцов, включая контроли.

## 3 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов ПЦР и раздельное выявление мишеней (ДНК ВПЧ определенного типа и внутреннего контроля (ВК)) обеспечивается применением в четырёх реакционных смесях для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции, соответствующим флуорофорам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 (см. таблицу 3). Для выявления ВПЧ используются ДНК-мишени, находящиеся в областях генов E6 и E7. В качестве ВК используется участок ДНК β-глобинового гена человека.

Таблица 3

**Каналы детекции мишеней**

| Смесь | Канал детекции сигнала от флуорофора | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | FAM | R6G[3] | ROX | Cy5 | Cy5.5 |
| Смесь HPV GT (R)-1 | 16 генотип | 18 генотип | 45 генотип | 31 генотип | ВК |
| Смесь HPV GT (R)-2 | 35 генотип | 33 генотип | 39 генотип | 51 генотип | ВК |
| Смесь HPV GT (R)-3 | 52 генотип | 58 генотип | 56 генотип | 59 генотип | ВК |
| Смесь HPV GT (R)-4 | 66 генотип | 68 генотип | 11 генотип | 6 генотип | ВК |

### 3.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК HPV

Концентрация клонированных фрагментов ДНК ВПЧ всех типов в ПК HPV составляет

[2] В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

[3] Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5 lg ± 0,5 lg копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [1, 2] согласно схеме, описанной в п. 5.6 ГОСТ ISO 17511-2011.

## 4 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 4.

Таблица 4

**Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором**

| Необходимое оборудование и материалы в случае[4] | |
|---|---|
| **автоматизированной подготовки к проведению ПЦР** | **ручной подготовки к проведению ПЦР** |
| • автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981);<br>• программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСЗ 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399));<br>• холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;<br>• ёмкость для сброса использованных материалов;<br>• перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные. | • ПЦР-бокс (РУ № ФСР 2010/07114);<br>• центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);<br>• дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 20 до 100 мкл (РУ № ФСР 2009/05681);<br>• штатив для ПЦР-планшетов (РУ № ФСЗ 2011/10287);<br>• программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСЗ 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399));<br>• холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;<br>• наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз (РУ № ФСЗ 2012/12077);<br>• ёмкость для сброса использованных материалов;<br>• перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные. |

## 5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ № 4н от 06.06.2012) – 2б.

Работа должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

• Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.

[4] В скобках указаны номера регистрационных удостоверений (РУ) для медицинских изделий, совместное применение с которыми было валидировано в ходе проведения клинических испытаний.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

• К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

• Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

• Утилизировать реагенты и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения) в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

• Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.

• Утилизировать внешнюю упаковку набора, инструкцию по применению и краткое руководство в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса А.

• Утилизировать биологический материал, а также расходные материалы и инструменты, загрязнённые биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса Б.

• Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 1 и 2.

• Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

• Не использовать набор по истечении срока годности.

• Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.

• Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.

• Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

Реагенты, входящие в состав набора, содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

## 6 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только биологического материала, указанного в разделе 1. Взятие исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;
- требованиями, перечисленными в таблице 5.

Таблица 5

**Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала**

| **Взятие мазков со слизистой оболочки влагалища** |
|---|
| Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А5 универсальный» или «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке). |
| **Взятие и предобработка соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала** |
| Взятие материала провести с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощётки (например, «Зонд тип F3 комбинированный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) или стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в ёмкость с:<br>• транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке; или<br>• средой для проведения жидкостной цитологии (например, жидкость консервирующая BD SurePath™ (Becton Dickinson and Company, США) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).<br>Предобработка:<br>**ВНИМАНИЕ!** При исследовании биоматериала, помещённого в среду для жидкостной цитологии, требуется его предобработка.<br>**ВНИМАНИЕ!** Необходимо использовать отдельный наконечник для каждого образца исследуемого материала.<br>Автоматическим дозатором на 1000 мкл отобрать 1,0 мл клеточного осадка со дна флакона с образцом и перенести в стерильную одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл, пробирку промаркировать. Центрифугировать 2 мин при 10000 x *g*. Не захватывая осадок, аккуратно удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 200 мкл без фильтра, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, или отдельным наконечником с фильтром, используя автоматический дозатор. В пробирке должно остаться 100–200 мкл среды с осадком. Перед внесением подготовленного образца в раствор для лизиса ресуспендировать клеточный осадок вортексированием. |

Транспортирование и хранение исследуемого материала проводится согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается однократное замораживание материала.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## 7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 7.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

**ВНИМАНИЕ!** Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

Экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей, а также внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки с реакционными Смесями HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3 и HPV GT (R)-4 провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «ДНК-ВПЧ (R)» (ООО «Амплитек»).

7.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ОК и ПК HPV и осадить капли на вортексе.

7.1.2 Подготовить картридж с реагентами из набора «ДНК-ВПЧ (R)» и внести в него исследуемые образцы и контроли согласно инструкции по его применению.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК HPV не менее чем в одном повторе.

7.1.3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «ДНК-ВПЧ (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.

7.1.4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесями HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3 и HPV GT (R)-4, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

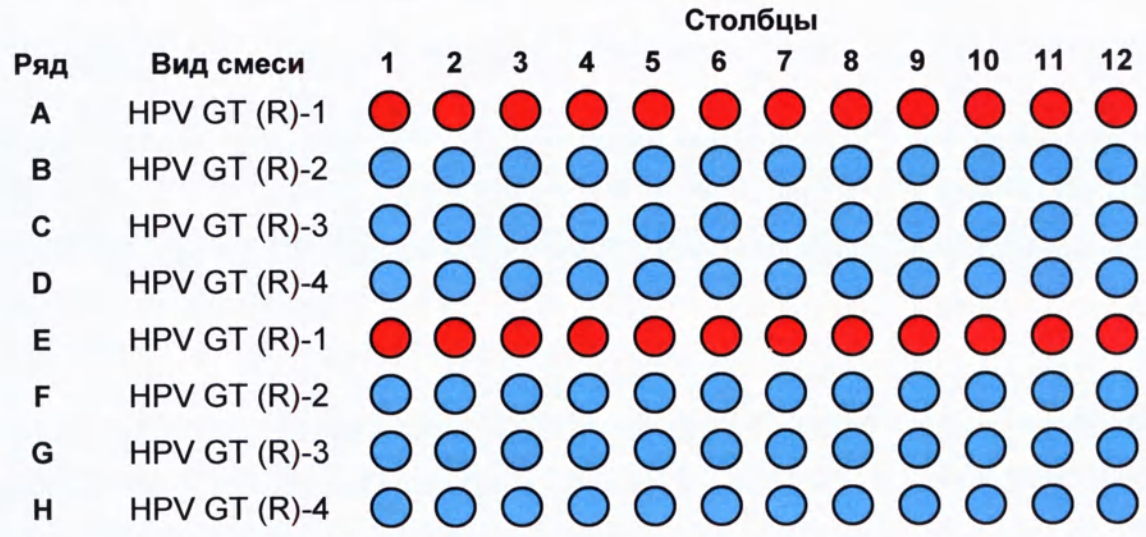


Рисунок 1 - Схема планшета с реагентами



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.1.5 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки необходимо использовать реагенты в течение 24 ч.

7.1.6 Установить отрезанные пробирки с Смесями на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

7.1.7 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «ДНК-ВПЧ (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции, равный 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «Amplitech HPV GT (R)».

7.1.8 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech HPV GT (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

7.1.9 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала по программе, указанной в таблице 6, согласно инструкции по его применению.

Таблица 6

**Программа ПЦР и детекции при подготовке к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1»**

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 2 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 5 с | – | 42 |
| | 60 | 20 с | FAM, R6G[5], ROX, Cy5, Cy5.5 | |

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) При одновременном поведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.

7.1.10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

[5] Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

### 7.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции

7.2.1 Провести экстракцию ДНК (с применением автоматической или ручной методики) из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «ДНК-ВПЧ (R)» (ООО «Амплитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объёме 100 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК HPV не менее чем в одном повторе. Перед использованием контролей перемешать их и осадить капли на вортексе.

7.2.2 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесями HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3 и HPV GT (R)-4, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

7.2.3 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки необходимо использовать реагенты в течение 24 ч.

7.2.4 Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.

7.2.5 Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК HPV).

**ВНИМАНИЕ!** Каждый образец ДНК вносится в четыре пробирки с разными реакционными Смесями, т.е. для каждого образца по одной пробирке с каждым видом Смеси (HPV GT (R)-1, HPV GT (R)-2, HPV GT (R)-3, HPV GT (R)-4).

**ВНИМАНИЕ!** При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7.2.6 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.

7.2.7 После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech HPV GT (R)».

7.2.8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала по программе, указанной в таблице 7, согласно инструкции по его применению.

Таблица 7

**Программа ПЦР и детекции при ручной подготовке к проведению ПЦР**

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 5 с | – | 42 |
| | 60 | 20 с | FAM, R6G[6], ROX, Cy5, Cy5.5 | |

[6] Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) При одновременном поведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.

7.2.9 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

## 8 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Проверить валидность исследуемых образцов, рассчитав концентрацию ДНК человека отдельно для каждого вида Смеси согласно формуле (1).

$$C_ч = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (1)$$

где $C_ч$ – концентрация ДНК человека, копий/мл;

ΔCt – разность между значением порогового цикла (Ct) для исследуемого образца и значением Ct для ПК HPV по каналу Cy5.5.

8.2 В случае, если концентрация ДНК человека для исследуемого образца для любой из Смесей получена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует, образцу присваивается результат «Невалидный».

8.3 При получении валидного результата для образца проверить наличие значения Ct для каждого вида Смеси по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5.

8.4 В случае, если значения Ct по всем каналам FAM, HEX, ROX, Cy5 для всех Смесей отсутствуют, образцу присваивается результат «ДНК ВПЧ не обнаружена».

8.5 При наличии значения/значений Ct по каналам FAM/HEX/ROX/Cy5 для любой из Смесей определить выявленный тип/типы ВПЧ с использованием таблицы 3. Выявленный тип определяется на пересечении наименования канала, для которого были получено значение Ct, и наименования Смеси.

8.6 Рассчитать концентрацию ДНК выявленного типа/типов ВПЧ согласно формуле (2).

$$C_{HPV} = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (2)$$

где $C_{HPV}$ – концентрация ДНК ВПЧ, копий/мл;

ΔCt – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК HPV по каналу FAM/HEX/ROX/Cy5[7].

[7] Канал детекции и Смесь для ПК HPV должны соответствовать каналу и Смеси для исследуемого образца. Расчёт производится отдельно по каждому из каналов.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8.7 Рассчитать вирусную нагрузку в копиях ДНК ВПЧ на $10^5$ клеток человека для выявленного типа/типов ВПЧ согласно формуле (3).

$$VL = \frac{C_{HPV}}{C_ч} \cdot 100000 \quad (3)$$

где VL – вирусная нагрузка ДНК ВПЧ, копий/$10^5$ клеток человека;
$C_{HPV}$ – концентрация ДНК ВПЧ, копий/мл;
$C_ч$ – концентрация ДНК человека, копий/мл.

8.8 Рассчитать суммарную вирусную нагрузку[8] в lg копий ДНК ВПЧ ВКР на $10^5$ клеток человека для выявленных типов ВПЧ ВКР согласно формуле (4).

$$VL_{сум} = \lg \Sigma C_{HPV} \quad (4)$$

где $VL_{сум}$ – суммарная вирусная нагрузка ДНК ВПЧ ВКР, lg копий/$10^5$ клеток человека;

lg Σ $C_{HPV}$ – сумма концентраций выявленных типов ДНК ВПЧ ВКР, копий/$10^5$ клеток человека.

8.9 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 8 и 9.

Таблица 8

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов**

| Результат | Описание |
|---|---|
| ДНК ВПЧ не выявлена | ДНК ВПЧ выявляемых типов в исследуемом образце не выявлена. |
| Выявлена ДНК ВПЧ в концентрации lg X копий ДНК ВПЧ/$10^5$ клеток человека, У типа | Исследуемый образец содержит ДНК ВПЧ определённого типа в указанной концентрации. |
| Невалидный | Концентрация ДНК человека (ВК) в исследуемом образце недостаточна для анализа. |

Таблица 9

**Интерпретация значений суммарной вирусной нагрузки[7] для исследуемых образцов при выявлении ДНК ВПЧ ВКР**

| Суммарная вирусная нагрузка, lg копий ДНК ВПЧ ВКР/$10^5$ клеток человека | Интерпретация |
|---|---|
| Менее 3 | Клинически малозначимая величина |
| От 3 до 5 | Клинически значимая величина. Существует риск дисплазии. |
| Более 5 | Клинически значимая величина. Высокая вероятность дисплазии. |

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

[8] Суммарная вирусная нагрузка не включает концентрации ДНК ВПЧ 6 и 11 типов.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

**Критерии оценки для контролей**

| Контроль | Норма |
|---|---|
| ОК | По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct отсутствует или определено не меньше граничного[9]. |
| ПК | По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct определено не больше граничного. |

## 9 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 11.

Таблица 11

**Рекомендации по устранению ошибок**

| Ошибка | Возможная причина возникновения | Рекомендации по устранению |
|---|---|---|
| Для ПК значение Ct каналу FAM и/или HEX и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного[8]. | Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР. | Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК. |
| Для ОК по каналу FAM и/или HEX и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение Ct меньше граничного. | Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации. | Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК. |
| Для исследуемого образца концентрация ДНК человека для любой из Смесей получена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует. | Нарушения при взятии и/или хранении биоматериала.<br>Некорректное проведение экстракции ДНК.<br>Наличие в образце ингибиторов ПЦР. | Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала. |

## 10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

### 10.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 8.

#### 10.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК HPV для контроля корректного прохождения исследования, а также для количественного определения ДНК ВПЧ выявляемых с помощью набора типов и ДНК β-глобинового гена человека в биологическом материале.

[9] Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

### 10.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации используется эндогенный ВК - ДНК человека (участок β-глобинового гена), который присутствует в каждом исследуемом биологическом образце и ПК HPV. Невалидные результаты амплификации для ВК свидетельствует о присутствии ингибиторов ПЦР в образце, плохом качестве взятия и/или хранения биоматериала, некорректном проведении экстракции ДНК.

### 10.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

### 10.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по количественному определению и генотипированию ДНК ВПЧ, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для количественного определения и генотипирования ДНК ВПЧ в биологическом материале методом ПЦР.

## 11 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА[10]

### 11.1 Предел обнаружения, диапазон измерения и предел измерения

Предел обнаружения набора составляет 1000 копий ДНК ВПЧ типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 6, 11 в 1 мл исследуемого образца для всех заявленных видов биологического материала.

Диапазон измерения набора составляет от 2000 до 200000000 копий ДНК ВПЧ типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 6, 11 в 1 мл исследуемого образца для всех заявленных видов биологического материала. Предел измерения набора совпадает с нижней границей диапазона измерения набора.

### 11.2 Аналитическая специфичность

По анализу результатов *in silico* выбранные олигонуклеотиды позволяют гарантировано дифференцировать ВПЧ типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 6, 11 как между собой, так и с другими известными типами ВПЧ. При этом подобранные праймеры и зонды на 100 % совпадают с опубликованными

[10] Заявленные аналитические характеристики набора проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями выявляемых типов ДНК ВПЧ.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

последовательностями выявляемых типов ВПЧ, представленными в базе NCBI по состоянию на 04 августа 2021 г.

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 12, и геномной ДНК человека. НК микроорганизмов в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК ВПЧ. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 12

**Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности**

| Наименование | Наименование | Наименование |
|---|---|---|
| *Candida albicans* | ВПЧ 6 типа | ВПЧ 45 типа |
| *Chlamydia trachomatis* | ВПЧ 11 типа | ВПЧ 51 типа |
| *Mycoplasma genitalium* | ВПЧ 16 типа | ВПЧ 52 типа |
| *Neisseria gonorrhoeae* | ВПЧ 18 типа | ВПЧ 56 типа |
| *Trichomonas vaginalis* | ВПЧ 26 типа | ВПЧ 58 типа |
| *Mycoplasma hominis* | ВПЧ 31 типа | ВПЧ 59 типа |
| *Escherichia coli* | ВПЧ 33 типа | ВПЧ 66 типа |
| *Treponema pallidum* | ВПЧ 35 типа | ВПЧ 68 типа |
| *Ureaplasma parvum* | ВПЧ 39 типа | ВПЧ 73 типа |
| – | ВПЧ 44 типа | ВПЧ 82 типа |

### 11.2.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 13.

Таблица 13

**Потенциально интерферирующие вещества**

| Исследуемый материал | Интерферент | Активный компонент | Тип интерферента | Концентрация вещества в образце | Обоснование исследованной концентрации |
|---|---|---|---|---|---|
| Мазки/ соскобы эпителия в транспортной среде, не предназначенной для жидкостной цитологии | Мирамистин® | Бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид моногидрат | Антисептическое средство для местного применения | 0,001 % | 10 % от рекомендованной дозы |
| | Гель-смазка интимная Contex Wave увлажняющий с пантенолом | Глицерин | Лубрикант | 15 % | Объём в образце в условиях «наихудшего случая» |
| | Цельная кровь | – | Эндогенная субстанция | 5 % v/v | |
| | Муцин | Очищенный белок | | 5 % v/v | |
| Соскобы эпителия в среде для жидкостной цитологии | Мирамистин® | Бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид моногидрат | Антисептическое средство для местного применения | 0,001 % | 10 % от рекомендованной дозы |
| | Гель-смазка интимная Contex Wave | Глицерин | Лубрикант | 15 % | Объём в образце в условиях |



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

| Исследуемый материал | Интерферент | Активный компонент | Тип интерферента | Концентрация вещества в образце | Обоснование исследованной концентрации |
|---|---|---|---|---|---|
| | увлажняющий с пантенолом | | | | «наихудшего случая» |
| | Транспортная среда BD SurePath™ | Метанол | Среда для жидкостной цитологии | 90 % | |
| | Цельная кровь | – | Эндогенная субстанция | 5 % v/v | |
| | Муцин | Очищенный белок | | 5 % v/v | |

Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивалось путём проведения процедуры экстракции[11] ДНК ВПЧ из модельных образцов биологического материала, в которые добавлялись потенциальные интерференты в концентрациях согласно таблице 13 и стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК ВПЧ выявляемых типов в концентрации 1000 копий/мл. Далее с экстрагированными образцами проводили ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» с использованием набора реагентов «Amplitech HPV GT (R)».

В результате испытаний подтверждено, что влияние исследованных потенциально интерферирующих веществ на ПЦР, проводимую с использованием набора «Amplitech HPV GT (R)», отсутствует.

### 11.3 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости $CV_п$ значений концентрации, характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости $CV_в$ значений концентрации, характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

### 11.4 Правильность измерения

Систематическая погрешность, характеризующая правильность измерения с использованием набора, не превышает 15 %.

### 11.5 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 14.

Таблица 14

**Диагностические характеристики**

| Исследуемый материал | Количество образцов | | ДЧ, % | ДС, % |
|---|---|---|---|---|
| | положит. | отрицат. | | |
| Мазки со слизистой оболочки влагалища в транспортной среде, не предназначенной для жидкостной цитологии | 80 | 80 | 96,3 – 100 | 96,3 – 100 |

[11] Экстракция проводилась с использованием набора реагентов «ДНК-ВПЧ (R)» (ООО «Амплитек»).



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

| Исследуемый материал | Количество образцов | | ДЧ, % | ДС, % |
|---|---|---|---|---|
| | положит. | отрицат. | | |
| Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде, не предназначенной для жидкостной цитологии | 160 | 160 | 98,1 – 100 | 98,1 – 100 |
| Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в среде для жидкостной цитологии | 80 | 80 | 96,3 – 100 | 96,3 – 100 |

### 11.6 Корреляция

Корреляция экспериментальных значений концентраций, полученных при исследовании образцов биологического материала с использованием набора реагентов «Amplitech HPV GT (R)» и референтных наборов реагентов, представлена на рисунке 2.

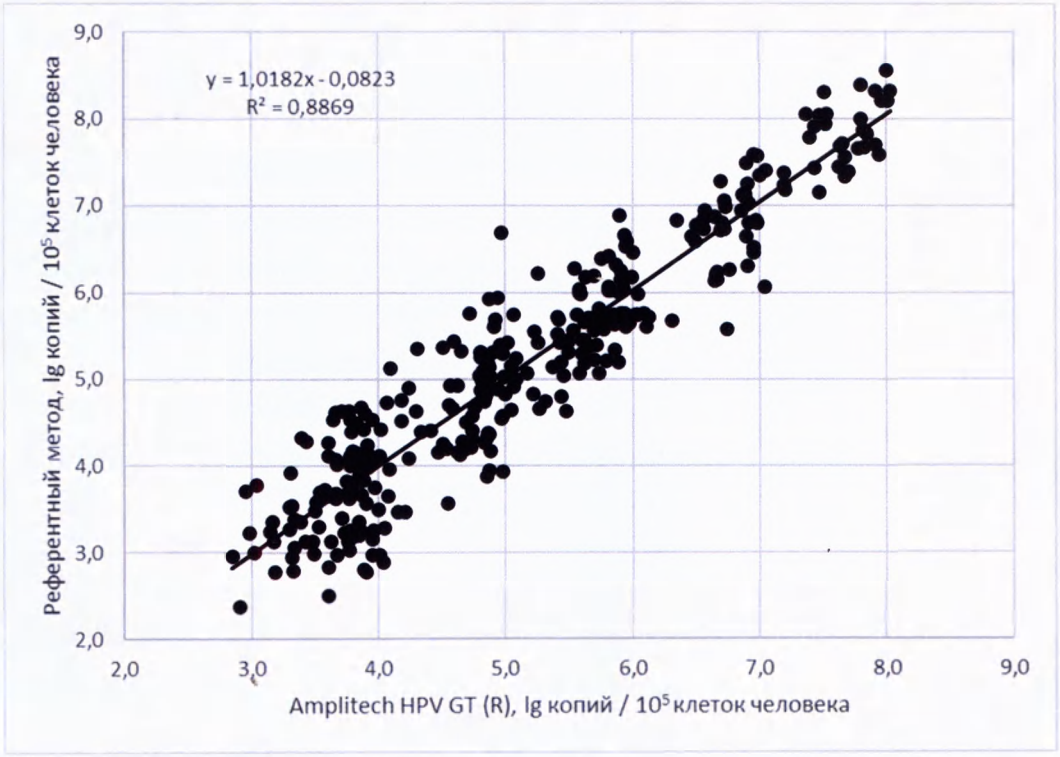


Рисунок 2

## 12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

### 12.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ПК HPV, ОК использовать до истечения срока годности набора. После снятия защитной плёнки реагенты Смесь HPV GT (R)-1, Смесь HPV GT (R)-2, Смесь HPV GT (R)-3 и Смесь HPV GT (R)-4 использовать в течение 24 ч.

### 12.2 Хранение

Набор хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от солнечного света месте. Планшет с реагентами HPV GT (R) беречь от влаги. Допускается хранить набор при температуре от 8 °С до 25 °С не более 5 суток.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

### 12.3 Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортировать набор при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

### 12.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Пробирки планшета с реагентами предназначены для однократного использования.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

## 13 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

| | |
|---|---|
| Ct | – cycle threshold (пороговый цикл) |
| HPV | – human papillomavirus |
| ВК | – внутренний контроль |
| ВПЧ | – вирус папилломы человека |
| ВПЧ ВКР | – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска |
| ДНК | – дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ДНКаза | – дезоксирибонуклеаза |
| ОК | – отрицательный контроль |
| ПК | – положительный контроль |
| ПЦР | – полимеразная цепная реакция |

## 14 БИБЛИОГРАФИЯ


1. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology, – 1981. – Vol. 126. – P. 1614-1619
2. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737-742


## 15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний




ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

Примечание - При использовании данного документа целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящей инструкции следует пользоваться заменённым (изменённым) ссылочным документом.


ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## 16 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

## 17 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

## 18 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Изготовитель | | Код серии |
| | Дата изготовления | | Использовать до |
| | Медицинское изделие для диагностики *in vitro* | | Предел температуры |
| | Обратитесь к инструкции по применению | | Не допускать воздействия солнечного света |
| | Содержимого достаточно для проведения n тестов | | Беречь от влаги |
| | Номер по каталогу | | |

ООО «Амплитек»,
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

## Лист регистрации изменений

| Изм. | Номера страниц | | | | Всего страниц в документе | Номер документа | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | изменённых | заменённых | новых | аннулированных | | | | |
| 1 | – | 2-21 | – | – | – | 19926214.022.1/5-22 | | 20.04.22 |
| 2 | – | 2-21 | – | – | – | 19926214.023-22 | | 28.04.22 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, скреплено и прошито

23

лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Амплитек»

А.В. Ходяков

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 23 ЛИСТОВ

«30» 05 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU