

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 18 » сентября 2023 г.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV)  
в клиническом материале методом полимеразной цепной  
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® HCV-FL»**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ .....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ .....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК .....	12
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	12
СОСТАВ .....	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	15
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	16
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР .....	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	18
В. Анализ и интерпретация результатов .....	20
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	26

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
МЕ	– международная единица
МУ	– методические указания
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОТ	– обратная транскрипция
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СанПиН	– санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>C<sub>t</sub></i>	– cycle threshold (пороговый цикл)
FL	– ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
<i>HBV</i>	– вирус гепатита В
<i>HCV</i>	– вирус гепатита С
<i>HDV</i>	– вирус гепатита D («Дельта»)

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *HCV-FL*» предназначен для качественного определения РНК вируса гепатита С (*HCV*) в клиническом материале методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из плазмы крови.

## Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала с целью выявления гепатита С.

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

## Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО), одновременной обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО	кДНК HCV
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	5' UTR

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

**Форма 4:** «ПЦР-комплект» вариант FRT

*Примечание – Формы 1, 2, 3 удалены.*

Форма 4 предназначена для проведения амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК.

Форма 4 рассчитана на проведение 112 реакций амплификации, включая контроли.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Таблица 2

### Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб», «РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	100
	200	«МАГНО-сорб»		50
	1000	«МАГНО-сорб»		10

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает РНК *HCV* различных генотипов. Были исследованы образцы генотипов 1a, 2b, 3a, 4a, 5, 6a в концентрации не менее  $1 \times 10^3$  МЕ/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее  $1 \times 10^5$  копий/мл (ГЭ/мл): вирус гепатита А (*HAV*), вирус гепатита В (*HBV*), вирус гепатита D (*HDV*), вирус иммунодефицита человека первого типа, цитомегаловирус (*CMV*), вирус Эпштейна-Барр (*EBV*), вирус простого герпеса типы 1, 2 (*HSV-1,2*), вирус ветряной оспы (*VZV*), вирус герпеса человека типы 6, 8 (*HHV-6, HHV-8*), парвовирус В19 (*Parvovirus*

B19), вирус клещевого энцефалита (*TBEV*), вирус лихорадки западного Нила (*WNV*), аденовирус типы 2, 3, 7 (*HadV-2*, *HadV-3*, *HadV-7*), вирус папилломы человека типы 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 59, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* и ДНК человека в концентрации 1 мг/мл.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов/вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

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

### **Повторяемость и воспроизводимость исследования**

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия, содержащего РНК *HCV* в концентрации 500 МЕ/мл. В качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

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

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

### **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы 100 образцов плазмы крови.

Было сформировано две группы образцов для проведения доклинических испытаний:

1. 50 образцов плазмы крови от доноров, которые были

обследованы на наличие маркеров вирусных гепатитов (HBsAg, anti-HCV) и маркеров синдрома цитолиза (АЛТ, АСТ).

- 50 образцов плазмы крови от пациентов с установленным диагнозом «хронический вирусный гепатит С» и определялись как положительные при тестировании набором реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» (ПУ № ФСР 2009/06187).

Таблица 4

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

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® HCV-FL»		Результаты применения референтного метода <sup>1</sup>	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего использовано 100 образцов	положительных	50	0
		отрицательных	0	50

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® HCV-FL»**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма крови	100 (92,89 – 100) %	100 (92,89 – 100) %

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических)

<sup>1</sup> В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» (ПУ № ФСР 2009/06187).

мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности форма 4 набора реагентов безопасна.

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

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

## **СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку<sup>2</sup>, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»

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

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette.
2. Центрифуга медицинская с принадлежностями.
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.

### **Экстракция РНК из исследуемых образцов**

4. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-сорб» (РУ ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» вариант 100-200 или вариант 100-1000 (РУ № ФСР 2010/07265).
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

---

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

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

6. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа» (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария)).
7. Комплект реагентов для экстракции РНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)).
8. Набор необходимых расходных материалов для автоматической станции.

**ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
8. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
9. Вортекс.
10. Автоматические дозаторы переменного объема.
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
13. Емкость для сброса наконечников.
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
  - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
  - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad

Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)).

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

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8 – 1,1 мм в пробирку с 6% раствором ЭДТА (K<sub>2</sub>ЭДТА или K<sub>3</sub>ЭДТА) или с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция РНК станет невозможной), и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток.

Допускается использование сыворотки крови. Диагностическая чувствительность ввиду соосаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК**

Образцы плазмы крови не требуют предварительной подготовки.

## **ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Для контроля эффективности экстракции РНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО *ICZ-гес*), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО *ICZ-гес*, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

### **Ограничения по использованию проб**

Непригодными для исследования являются:

- образцы плазмы крови с гемолизом;
- образцы плазмы крови, подвергшиеся многократному замораживанию-оттаиванию;
- образцы плазмы крови, полученные из образцов крови, взятой в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

### **Потенциально интерферирующие вещества**

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

Были протестированы:

- образцы ВГС-негативной плазмы крови без добавления и с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в таблице 6. Анализу подвергались как образцы, не содержащие РНК *HCV*, так и образцы с добавлением стандартного образца предприятия до конечной концентрации РНК *HCV* 500 МЕ/мл;

- образцы плазмы крови, полученные из цельной крови, забранной в пробирки с К<sub>2</sub>ЭДТА и К<sub>3</sub>ЭДТА в качестве антикоагулянтов.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	160 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		250 г/л	Не обнаружено
	Триглицериды	3,7 ммоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		37 ммоль/л	Не обнаружено
	Билирубин	21 мкмоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		210 мкмоль/л	Не обнаружено
Белок	85 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено	
	120 г/л	Не обнаружено	
Экзогенные вещества	Лития гепарин <sup>3</sup>	12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА <sup>3</sup>	2 мг/мл	Не обнаружено

<sup>3</sup> В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калий ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

## СОСТАВ

### СОСТАВ

**«ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК вируса гепатита С (*HCV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL <i>HCV</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
KB2 <i>HCV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1- <i>HCV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

**Эксплуатационная документация** в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя ([www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)).

### ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- проведение обратной транскрипции и амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

### ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

**ВНИМАНИЕ!** При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб». Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-сорб» смотрите в Приложении А.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec**.

Объем **ВКО ICZ-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа».

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec**.

Объем **ВКО ICZ-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

---

Объем исследуемого образца:

- 200 мкл;
- 1000 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**.

Объем элюции – **70 мкл** (или **75 мкл** при экстракции с помощью MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария)).

РНК-пробы могут храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

### **ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

**ВНИМАНИЕ!** При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

**Выбор пробирок для ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме реального времени.**

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

#### **А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР**

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL НCV**, **5 мкл ПЦР-буфера-С**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**, **0,5 мкл Полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

---

2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV**, **ПЦР-буфера-С**, **RT-G-mix-2**, **Полимеразы (TaqF)** и **ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. Приготовленная смесь не хранится.
4. Отобрать необходимое количество пробирок для ОТ-ПЦР с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (см. табл. 7).
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

7. Поставить контрольные реакции:
  - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы РНК**, экстрагированной из **ПКО-1-HCV**.
  - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы РНК**, экстрагированной из **ОКО**.
  - в) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл KB2 HCV**.

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

**Схема приготовления реакционных смесей**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом на один образец				
		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число исследуемых образцов	Число проб в ПЦР <sup>4</sup>	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
4	7	80	40	2,0	4,0	2,0
6	9	100	50	2,5	5,0	2,5
8	11	120	60	3,0	6,0	3,0
10 <sup>5</sup>	13	140	70	3,5	7,0	3,5
12	15	160	80	4,0	8,0	4,0
14	17	180	90	4,5	9,0	4,5
16	19	200	100	5,0	10,0	5,0
18	21	220	110	5,5	11,0	5,5
20	23	240	120	6,0	12,0	6,0
22 <sup>6</sup>	25	260	130	6,5	13,0	6,5
34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9).

<sup>4</sup> Число исследуемых образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество исследуемых образцов).

<sup>5</sup> Панель из 12 пробирок на экстракцию.

<sup>6</sup> Панель из 24 пробирок на экстракцию.

Таблица 8

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа<sup>7</sup>**

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются, если проводятся тесты, для которых используются эти каналы.

Таблица 9

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа<sup>8</sup>**

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX и Cy5 включаются, если

<sup>7</sup> Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

<sup>8</sup> Например, «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX 96 (Bio-Rad, США).

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

проводятся тесты, для которых используются эти каналы.

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

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

### В. Анализ и интерпретация результатов

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

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО	кДНК HCV

Анализ полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла ( $C_t$ ), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

**Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов**

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	кДНК HCV <b>НЕ обнаружена</b>
больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	кДНК HCV <b>обнаружена</b>
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<b>Невалидный*</b>

\* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

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

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции РНК и ОТ-ПЦР в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**

Таблица 12

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
ПК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К-	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

**Возможные ошибки:**

- Для положительного контроля экстракции (ПК) и/или положительного контроля ОТ-ПЦР (К+):
  - по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (Ct) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов, в которых не обнаружена кДНК

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

---

- HCV*. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена кДНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.
- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
- а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена кДНК *HCV*. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.
  - б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

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

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

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

### **Хранение.**

**Форма 4.** «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается хранение RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV, KB2 HCV, буфера для элюции, ОКО, ПКО-1-HCV и ВКО ICZ-rec при температуре ниже минус 24 °С. Не допускается замораживание/оттаивание KB2 HCV, ПКО-1-HCV и ВКО ICZ-rec более двух раз. После размораживания ПКО-1-HCV, KB2 HCV и ВКО ICZ-rec хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно  
для проведения n тестов



Медицинское изделие для  
диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по  
применению



Предел температуры



Не допускать воздействия  
солнечного света



Верхняя граница  
температурного диапазона



Дата изготовления



Изготовитель

## **ПРИЛОЖЕНИЕ А**

### **Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»**

1. Прогреть **лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. В каждую пробирку внести по **10 мкл ВКО ICZ-рес.**
4. В пробирки с ВКО внести по **450 мкл лизирующего раствора.**

*При большом количестве образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе **лизирующего раствора и ВКО ICZ-рес** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим внесением по **450 мкл смеси** в заранее подготовленные пробирки объемом 1,5 мл.*

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) с **лизирующим раствором и ВКО** внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV.**
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) с **лизирующим раствором и ВКО** внести **100 мкл ОКО.**
8. Закрывать крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости с крышек пробирок кратким центрифугированием.
9. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин.** Осадить капли конденсата с крышки кратким центрифугированием (пункт 9 выполнять только в случае одновременной экстракции РНК гепатита С и ДНК гепатита В и/или РНК гепатита D).
10. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента.** Перемешать на вортексе, поставить на 10 мин при комнатной температуре,

- тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента на центрифуге при **7 тыс g** (например, 10 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
  12. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение **1 мин**.
  14. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение **1 мин**.
  16. Не захватывая осадок удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  17. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. **15-16**.
  18. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение **1 мин**.
  19. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  20. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **60 °C** на **12-15** мин для подсушивания сорбента.
  21. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Закрыть пробирки и перемешать на вортeксе. Поместить в термостат при температуре **60 °C** на **2-3 мин**.
  22. Перемешать на вортeксе и осадить сорбент на центрифуге при **12-13 тыс g** (например, 13,4 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение **1 мин**. Надосадочная

жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

Отбор очищенной РНК для проведения ОТ-ПЦР проводить осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

РНК-пробы могут храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.



Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)



## Краткое руководство

### набор реагентов «АмплиСенс® HCV-FL»

Форма 4

**REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)  
**REF** H-0194-1



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

**IVD**

**VER** 28.12.23

**ВНИМАНИЕ!** Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

#### ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

**Комплекты для экстракции:**

- «РИБО-сорб»;
- «РИБО-преп»;
- «МАГНО-сорб».

**Контроли:** внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

#### ОБЪЕМЫ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА, КОНТРОЛЕЙ, ЭЛЮЦИИ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ «РИБО-преп», «МАГНО-сорб»

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО ICZ-гес	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b>
ОКО + ПКО-1-HCV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b>
Элюция		
все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:		
ВКО ICZ-гес	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	200 или 1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b>
ОКО + ПКО-1-HCV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b>
Элюция		
все образцы	70 мкл	в каждую пробирку

## ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ «РИБО-сорб»

Образец/реагент	Объем	Действие
ВКО ICZ-rec	10 мкл	добавить в каждую пробирку
Лизирующий раствор	450 мкл	добавить в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	добавить в пробирки для исследуемых образцов
ОКО + ПК-1-НСV	90 мкл + 10 мкл	добавить в пробирку для ПК
ОКО	100 мкл	добавить в пробирку для ОК
<b>Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:</b>		
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли;</li> <li>- поместить в термостат на <b>10 мин</b> при <b>60 °С</b>;</li> <li>- осадить капли</li> </ul>
Сорбент	25 мкл	ресуспендировать, добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, перемешать на вортексе;</li> <li>- оставить на <b>10 мин</b> при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые <b>2 мин</b>;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 1	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 4	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость;</li> <li>- открыть крышки, подсушить осадок <b>12-15 мин</b> при <b>60 °С</b></li> </ul>
РНК-буфер	50 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- прогреть <b>2-3 мин</b> при <b>60 °С</b>, перемешать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>12-13 тыс g</b></li> </ul>
<b>Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК</b>		

**ВНИМАНИЕ!** Отбор очищенной РНК для проведения ПЦР проводить осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

## **ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

**Общий объем реакционной смеси:** 25 мкл, включая объем пробы РНК (10 мкл).

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный контроль ПЦР (К+), 1 положительный (ПК), 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	10x(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5x(N+K+1)	
RT-G-mix-2	0,25x(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5x(N+K+1)	
ТМ-Ревертаза (MMIv)	0,25x(N+K+1)	

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл		
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку	
Внести по 10 мкл		
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов	<i>При проведении экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы РНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК	
Пробы РНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК	
KB2 HCV	в пробирку для К+	

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

## **ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени»

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного типа				Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5	95	5 с	–	5
	60	20 с	–		60	20 с	–	
	72	15 с	–		72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow		60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

## **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО	кДНК HCV

**ВНИМАНИЕ!** К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, граничные значения порогового цикла (Ct), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

«02» *сентября* 2024 г.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV)  
в клиническом материале методом полимеразной цепной  
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® HBV-FL»**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ .....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ .....	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК .....	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	11
СОСТАВ .....	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....	15
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	16
А. Подготовка проб для амплификации .....	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	18
В. Анализ и интерпретация результатов .....	20
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ .....	24
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	25
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ .....	26
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	27

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
МЕ	– международная единица
МУ	– методические указания
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СанПиН	– санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>Ct</i>	– cycle threshold (пороговый цикл)
FL	– ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
<i>HBV</i>	– вирус гепатита В
<i>HCV</i>	– вирус гепатита С
<i>HDV</i>	– вирус гепатита D («Дельта»)

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *HBV-FL*» предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из плазмы крови.

### Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала с целью выявления ДНК вируса гепатита В.

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

## Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого вируса и ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО	ДНК <i>HBV</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	gene C

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

**Форма 4:** «ПЦР-комплект» вариант FRT

*Примечание – Формы 1, 2, 3 удалены.*

Форма 4 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 4 рассчитана на проведение 112 реакций амплификации, включая контроли.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Таблица 2

### Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Вид исследуемого материала	Объём образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	100
		«РИБО-преп»		50
	200	«МАГНО-сорб»		50
	1000	«МАГНО-сорб»		10

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает ДНК *HBV*.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана посредством добавления в реакцию ДНК человека, а также геномной ДНК/РНК следующих микроорганизмов и вирусов в концентрации порядка  $1 \times 10^3$  копий/мл или выше: вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус иммунодефицита человека 1 типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека 6 типа, парвовирус B19, аденовирус 2 типа, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов/вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

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

### **Повторяемость и воспроизводимость исследования**

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *HBV* в концентрации выше предела обнаружения. В качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

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

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

### **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

- 50 образцов плазмы крови от доноров с отсутствием маркеров вирусных гепатитов (HBsAg, anti-HCV) и маркеров синдрома цитолиза (АЛТ, АСТ);
- 50 образцов плазмы крови пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит В». Наличие ДНК *HBV* подтверждено при тестировании с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *HCV / HBV / HIV-FL*».

Таблица 4

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

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® HBV-FL»		Результаты применения референтного метода <sup>1</sup>	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего использовано 100 образцов	положительных	50	0
		отрицательных	0	50

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов  
«АмплиСенс® HBV-FL»**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма крови	100 (92,89 – 100) %	100 (92,89 – 100) %

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного

<sup>1</sup> В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® HCV / HBV / HIV-FL» (ПУ № ФСР 2009/06187).

количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности форма 4 набора реагентов безопасна.

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

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

## **СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком

годности, использованные реагенты, упаковку<sup>2</sup>, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette.
2. Центрифуга медицинская с принадлежностями.
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.

### **Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

4. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-сорб» (РУ № ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» вариант 100-200 или вариант 100-1000 (РУ № ФСР 2010/07265).
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

### **Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
8. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс)

---

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

- или бокс микробиологической безопасности II класса защиты).
9. Центрифуга-вортекс.
  10. Автоматические дозаторы переменного объема.
  11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
  13. Емкость для сброса наконечников.
  14. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
    - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
    - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
    - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
  15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96 / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229))).
  16. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версия 1.0.0 или выше.

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

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8–1,1 мм в пробирку с 6 % раствором ЭДТА (K<sub>2</sub>ЭДТА или K<sub>3</sub>ЭДТА) или с цитратом натрия в качестве

антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной) и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток.

Допускается использование сыворотки крови. Диагностическая чувствительность ввиду осаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 суток при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

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

Образцы плазмы крови не требуют предварительной подготовки.

## **ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI 87), который добавляется в каждый биологический

образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО STI 87, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

### Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

- образцы плазмы крови с гемолизом;
- образцы плазмы крови, подвергшиеся многократному замораживанию-оттаиванию;
- образцы плазмы крови, полученные из образцов крови, взятой в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

### Потенциально интерферирующие вещества

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

Были протестированы модельные образцы плазмы крови без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Модельные образцы плазмы крови содержали стандартный образец предприятия, содержащий ДНК *HBV* в концентрации 500 МЕ/мл.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	160 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		250 г/л	
	Триглицериды	3,7 ммоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		37 ммоль/л	
	Билирубин	21 мкмоль/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		210 мкмоль/л	
	Белок	85 г/л (верхняя граница нормы)	Не обнаружено
		120 г/л	

Экзогенные вещества	Лития гепарин <sup>3</sup>	12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА <sup>3</sup>	2 мг/мл	Не обнаружено

---

<sup>3</sup> В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

**СОСТАВ**

**«ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для амплификации участка ДНК вируса гепатита В (*HBV*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
<b>ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i></b>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
<b>ПЦР-буфер-В</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
<b>Полимераза (TaqF)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
<b>KB2 <i>HBV</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
<b>Буфер для элюции</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
<b>ПКО-1-<i>HBV</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
<b>ВКО STI-87</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

**Программное обеспечение** AmpliSens® *HBV* Soft версия 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя ([www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)).

**Эксплуатационная документация** в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыши к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя ([www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)).

### ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

### ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

**ВНИМАНИЕ!** При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб». Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-сорб» смотрите в Приложении А.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**.

Объем ВКО STI-87 – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**.

Объем ВКО STI-87 – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца:

- 200 мкл;

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

---

– 1000 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**.

Объем элюции – **70 мкл**.

### **АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

**ВНИМАНИЕ!** При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

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

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

#### **А. Подготовка проб для амплификации**

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL HBV**, **5 мкл ПЦР-буфера-В** и **0,5 мкл Полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL HBV**, **ПЦР-буфера-В** и **Полимеразы (TaqF)**. Тщательно

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

---

перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. Приготовленная смесь не хранится.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (см. табл. 7).
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

7. Поставить контрольные реакции:
  - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы ДНК**, экстрагированной из ПКО-1-*HBV*.
  - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы ДНК**, экстрагированной из ОКО.
  - в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл KB2 HBV**.

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

**Схема приготовления реакционных смесей**

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное количество исследуемых образцов с запасом на один образец		
		10,00	5,00	0,50
Число исследуемых образцов	Число проб в ПЦР <sup>4</sup>	ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i>	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
4	7	80	40	4,0
6	9	100	50	5,0
8	11	120	60	6,0
10 <sup>5</sup>	13	140	70	7,0
12	15	160	80	8,0
14	17	180	90	9,0
16	19	200	100	10,0
18	21	220	110	11,0
20	23	240	120	12,0
22 <sup>6</sup>	25	260	130	13,0
34	37	380	190	19,0
46	49	500	250	25,0

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

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

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

2. Запустить программу амплификации:

а) либо с использованием ПО AmpliSens<sup>®</sup> RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens<sup>®</sup> *HBV* Soft.

Примечание — Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens<sup>®</sup> RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 и выше.

б) либо в ручном режиме, запрограммировав

<sup>4</sup> Число исследуемых образцов + 2 контроля этапа экстракции ДНК + 1 контроль ПЦР (N+3, N - количество исследуемых образцов).

<sup>5</sup> Панель из 12 пробирок на экстракцию.

<sup>6</sup> Панель из 24 пробирок на экстракцию

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 8 или 9, согласно инструкции по его применению.

Таблица 8

### Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа<sup>7</sup>

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HDV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 9

### Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа<sup>8</sup>

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE	
	72	15 с	–	

<sup>7</sup> Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).

<sup>8</sup> Например, «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HDV*, генотипирования *HCV* и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

### В. Анализ и интерпретация результатов

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

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят вручную с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *HBV* Soft версия 1. Порядок работы с ПО AmpliSens® *HBV* Soft версия 1 описан в руководстве оператора.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК ВКО	ДНК <i>HBV</i>

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (*Ct*), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *HBV* Soft значения *Ct* определяются автоматически.

Принцип интерпретации результатов следующий:

**Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов**

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	ДНК <i>HBV</i> <b>НЕ обнаружена</b>
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>HBV</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<b>Невалидный*</b>

\* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля экстракции (ПК):
  - а) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (Ct) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

---

- исследуемых образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*, начиная с этапа экстракции ДНК.
- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Для положительного контроля ПЦР (К+):
- а) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*.
  - б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводить согласно таблице 11.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK):
- а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе исследуемых образцов / реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*, начиная с этапа экстракции ДНК.
  - б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа

- экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (К–):
    - а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе исследуемых образцов / реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*.
    - б) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация исследуемых образцов / реагентов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации. Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводить согласно таблице 11.
  5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии или при анализе результатов в автоматическом режиме, требуется повторно провести амплификацию для такого образца.

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

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

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

### **Хранение.**

Форма 4. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается хранение ПЦР-смеси-1-FL *HBV*, KB2 *HBV*, буфера для элюции, ОКО, ПКО-1-*HBV* и ВКО STI-87 при температуре ниже минус 24 °С. Не допускается замораживание/оттаивание KB2 *HBV*, ПКО-1-*HBV* и ВКО STI-87 более двух раз. После размораживания KB2 *HBV*, ПКО-1-*HBV* и ВКО STI-87 хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ПЦР-смесь-1-FL *HBV* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: [obtk@pcr.ru](mailto:obtk@pcr.ru). Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхняя граница температурного диапазона



Дата изготовления



Изготовитель

## **ПРИЛОЖЕНИЕ А**

### **Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»**

1. Прогреть **Лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 60°C до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО STI-87**.
4. В пробирки с ВКО внести по **450 мкл лизирующего раствора**.

*При большом количестве образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном одноразовом флаконе **лизирующего раствора** и **ВКО STI-87** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим внесением по **450 мкл смеси** в заранее подготовленные пробирки объемом 1,5 мл.*

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести **100 мкл ОКО**.
8. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости с крышек пробирок кратким центрифугированием.
9. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**. Осадить капли конденсата с крышки кратким центрифугированием.
10. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента**. Перемешать на вортексе, оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента на

- центрифуге при **7 тыс g** (например, 10 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
12. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение 1 мин.
  14. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение 1 мин.
  16. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  17. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. **15-16**.
  18. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **7 тыс g** в течение 1 мин.
  19. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  20. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **60 °C** на **12-15** мин для подсушивания сорбента.
  21. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Закрыть пробирки и перемешать на вортeксе. Поместить в термостат при температуре **60 °C** на **2-3** мин.
  22. Перемешать на вортeксе и осадить сорбент на центрифуге при **12-13 тыс g** (например, 13,4 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Отбор очищенной ДНК для проведения ПЦР проводить

осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

ДНК-пробы могут храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение года.









Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)

## Краткое руководство

### набор реагентов «АмплиСенс® HBV-FL»

Форма 4

**REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)



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

**IVD**

**VER** 06.06.24

**ВНИМАНИЕ!** Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

#### **ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

**Комплекты для экстракции:**

- «РИБО-сорб»;
- «РИБО-преп»;
- «МАГНО-сорб».

**Контроли:** внутренний контрольный образец (ВКО) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

#### **ОБЪЕМЫ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА, КОНТРОЛЕЙ, ЭЛЮЦИИ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ «РИБО-преп», «МАГНО-сорб»**

##### **При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:**

ВКО STI-87	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b>
ОКО + ПКО-1-HBV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b>

##### **Элюция**

все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
-------------	--------	-------------------

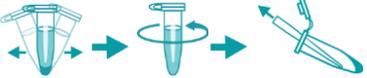
##### **При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:**

ВКО STI-87	10 мкл	в каждый образец
Исследуемые образцы	200 или 1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b>
ОКО + ПКО-1-HBV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b>

##### **Элюция**

все образцы	70 мкл	в каждую пробирку
-------------	--------	-------------------

## ЭКСТРАКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ «РИБО-сорб»

Образец/реагент	Объем	Действие
ВКО STI-87	10 мкл	добавить в каждую пробирку
Лизирующий раствор	450 мкл	добавить в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	добавить в пробирки для исследуемых образцов
ОКО + ПК-1- <i>HBV</i>	90 мкл + 10 мкл	добавить в пробирку для <b>ПК</b>
ОКО	100 мкл	добавить в пробирку для <b>ОК</b>
<b>Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:</b>		
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли;</li> <li>- поместить в термостат на <b>10 мин</b> при <b>60 °С</b>;</li> <li>- осадить капли</li> </ul>
Сорбент	25 мкл	ресуспендировать, добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, перемешать на вортексе;</li> <li>- оставить на <b>10 мин</b> при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые <b>2 мин</b>;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 1	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость</li> </ul>
Раствор для отмывки 4	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>7 тыс g</b>;</li> <li>- удалить надосадочную жидкость;</li> <li>- открыть крышки, подсушить осадок <b>12-15 мин</b> при <b>60 °С</b></li> </ul>
РНК-буфер	50 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе;</li> <li>- прогреть <b>2-3 мин</b> при <b>60 °С</b>, перемешать на вортексе;</li> <li>- центрифугировать <b>1 мин</b> при <b>12-13 тыс g</b></li> </ul>
<b>Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК</b>		

**ВНИМАНИЕ!** Отбор очищенной ДНК для проведения ПЦР проводить осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге при 12-13 тыс g в течение 1 мин.

## ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

**Общий объем реакционной смеси:** 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный контроль ПЦР (К+), 1 положительный (ПК), 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *HBV*.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i>	10x(N+K+1)	<b>N</b> – количество исследуемых образцов; <b>K</b> – количество контролей; <b>1</b> – запас
ПЦР-буфер-В	5x(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5x(N+K+1)	

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ПЦР исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл		
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку	
Внести по 10 мкл		
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов	<i>При проведении экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК	
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК	
KV2 <i>HBV</i>	в пробирку для К+	

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

## АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить программу амплификации:

- а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *HBV* Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS);
- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного типа				Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5	95	5 с	–	5
	60	20 с	–		60	20 с	–	
	72	15 с	–		72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow		60	30 с	FAM, JOE/HEX	
	72	15 с	–		72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** В случае если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК *HBV*, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 мин) для экономии времени.

## АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *HBV* Soft:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК ВКО	ДНК <i>HBV</i>

**ВНИМАНИЕ!** К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, граничные значения порогового цикла (*C<sub>t</sub>*), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов вручную.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 06 июня 2024 года № ФСР 2007/00585

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HBV-FL»**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Производитель

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Место производства медицинского изделия

**см.приложение**

Номер регистрационного досье № РД-62766/36033 от 14.05.2024

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 06 июня 2024 года № 3371  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения**



**Д.Ю. Павлюков**

0076411

**ПРИЛОЖЕНИЕ**  
**К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**  
**НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 06 июня 2024 года № ФСР 2007/00585

Лист 1

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HBV-FL»:**

Формы комплектации:

Форма 4: «ПЦР-комплект» вариант FRT:

«ПЦР-комплект» вариант FRT - комплект реагентов для амплификации участка ДНК вируса гепатита В (HBV) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» - включает:

- 1) ПЦР-смесь-1-FL HBV - 4 пробирки (0,3 мл);
- 2) ПЦР-буфер-В - 4 пробирки (0,2 мл);
- 3) Полимераза (TaqF) - 4 пробирки (0,02 мл);
- 4) KB2 HBV - 4 пробирки (0,1 мл);
- 5) Буфер для элюции - 2 пробирки (1,2 мл);
- 6) ОКО - 4 пробирки (1,2 мл);
- 7) ПКО-1-HBV - 4 пробирки (0,06 мл);
- 8) ВКО STI-87- 4 пробирки (0,28 мл);

Программное обеспечение, включая руководство оператора, может быть предоставлено на электронном носителе информации или представлено на официальном сайте изготовителя (уполномоченного лица изготовителя):

- Программное обеспечение AmpliSens® HBV Soft версия 1 - 1 шт.
- Руководство оператора - 1 шт.

Эксплуатационная документация может быть изготовлена в бумажном виде и представлена на официальном сайте изготовителя (уполномоченного лица изготовителя):

- Инструкция по применению - 1 шт.;
- Паспорт качества набора реагентов - 1 шт.;
- Вкладыш к набору реагентов - 1 комплект;
- Краткое руководство к набору реагентов - 1 шт.

Техническая документация: ТУ 9398-030-01897593-2012.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0143172



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2011/12382

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита D (HDV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® HDV-FL" по ТУ 9398-178-01897593-2012**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Производитель

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Место производства медицинского изделия

**см. приложение**

Номер регистрационного досье № РД-26169/11224 от 04.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1984  
допущено к обращению на территории Российской Федерации

**Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения**

**Д.Ю. Павлюков**



**0042636**

**ПРИЛОЖЕНИЕ  
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года № ФСР 2011/12382

Лист 1

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита D (HDV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® HDV-FL" по ТУ 9398-178-01897593-2012:**  
Формат FER.

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 - 2 штуки,

«ПЦР-комплект» вариант FER;

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 - 2 штуки,

«ПЦР-комплект» вариант FER;

Форма 3 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000,

«ПЦР-комплект» вариант FER;

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 - 2 штуки,

«ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 - 2 штуки,

«ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 3 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000,

«ПЦР-комплект» вариант FRT.

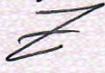
Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва,  
ул. Новогиреевская, д. 3А.

2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва,  
ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

  
Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения

  
Д.Ю. Павлюков  
0054167

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от 10.04.2012 № 1667-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ  
Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
\_\_\_\_\_  
В.И.Покровский  
«15» апреля 2012 г.

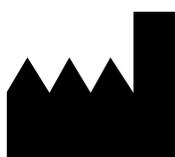


## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления РНК вируса гепатита D (*HDV*) в клиническом  
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *HDV-FL*»**

**АмплиСенс®**



Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Центральный научно-исследовательский  
институт эпидемиологии»,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	12
ФОРМАТ FER .....	13
СОСТАВ .....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ ...	17
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	17
Б. Проведение амплификации.....	21
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» .....	21
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	23
ФОРМАТ FRT .....	25
СОСТАВ .....	25
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	27
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	29
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	30
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	31
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	33
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- ПРЕП».....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- СОРБ» .....	40
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- СОРБ» .....	43
А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы .....	43
Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы .....	45
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	48

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
К+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОТ	– обратная транскрипция
ПКО	– положительный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	– флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HBV	– вирус гепатита В
HCV	– вирус гепатита С
HDV	– вирус гепатита D («Дельта»)
HGV	– вирус гепатита G

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *HDV-FL*» предназначен для выявления РНК вируса гепатита D (*HDV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из плазмы крови.

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

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови совместно с ВКО, проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» (формат FEP) или в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ВКО. По каналу, соответствующему флуорофору JOE, детектируется продукт амплификации кДНК *HDV*. Положительный контрольный образец этапа экстракции

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

ПКО *HDV*-рес детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (*HDV*). Контрольный образец амплификации – ПКО кДНК *HDV*-FL – является комплексным для *HDV* и ВКО и аналогично детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (*HDV*).

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

**Набор реагентов выпускается в 2 форматах:**

### **Формат FEP**

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FEP./\*

**Форма 2** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

**Форма 3** включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

**Форма 4** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP.

**Форма 5** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала магнитной сепарацией, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения

Формат FEP Форма 4: [REF](#) V3-FEP; [REF](#) H-1784-2; Формат FRT Форма 4: [REF](#) R-V3(RG,iQ,Mx,Dt);

[REF](#) H-1784-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 4 из 48

обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

### **Формат FRT**

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 2** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 3** включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 4** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала магнитной сепарацией, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме

«реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

Формат	Объём экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность, копий/мл
Формат FEP	100	«РИБО-сорб» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	500
	200	«МАГНО-сорб»	250
	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	50
Формат FRT	100	«РИБО-сорб» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	100
	200	«МАГНО-сорб»	50
	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	10

### Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, парвовирус В19, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки западного Нила, Аденовирус типы 2, 3, 7, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens*.

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими

Формат FEP Форма 4: **REF** V3-FEP; **REF** H-1784-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt);

**REF** H-1784-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 7 из 48

отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранить в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное

- место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала**

1. Ламинарный бокс.
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл.
6. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) или «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008):

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс г.
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
4. Одноразовые наконечники до 200 мкл.
5. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (ТУ 9398-106-01897593-2012):

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные.
8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм.
9. Автоматический дозатор переменного объема с возможностью

дозирования от 1000 до 5000 мкл.

10. Одноразовые наконечники до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)).
3. Для автоматической станции например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) требуется дополнительный комплект реагентов «ЕМ-плюс» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

**ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации**

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплексом» (вариант FEP):

9. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axugen, США) или аналогичные).
10. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), «Джин-2» (версия п.о. не ниже 4.4i) («ДНК-Технология», Россия) или

Формат FEP Форма 4: **REF** V3-FEP; **REF** H-1784-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt);

**REF** H-1784-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 11 из 48

аналогичные).

При работе с «ПЦР-комплексом» (вариант FRT):

11. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)) или амплификатор планшетного типа (например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США)) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
  - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой - при использовании прибора планшетного типа;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа.

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

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

В отдельных случаях допускается использование сыворотки крови. Аналитическая чувствительность набора реагентов для данного материала сохраняется, однако клиническая чувствительность ввиду осаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

Формат FEP Форма 4: **REF** V3-FEP; **REF** H-1784-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt);

**REF** H-1784-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 12 из 48

**ФОРМАТ FEP  
СОСТАВ**

**Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>2</sup>	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 1 в количестве 2-х шт.

**Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>2</sup>	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>2</sup>	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 2 в количестве 2-х шт.

<sup>2</sup> При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов

**Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>Лизирующий раствор МАГНО-сорб</b>	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup>	70	4 флакона
<b>Компонент А</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
<b>Раствор для отмывки 5</b>	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup>	60	4 флакона
<b>Раствор для отмывки 6</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
<b>Раствор для отмывки 7</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
<b>Магнетизированная силика</b>	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
<b>Буфер для элюции</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл.

Входит в состав формы комплектации 3.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP** – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита D (*HDV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>RT-G-mix-2</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
<b>ОТ-ПЦР-смесь-1-FL <i>HDV</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
<b>ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
<b>Минеральное масло для ПЦР</b>	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
<b>Полимераза (TaqF)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
<b>ТМ-Ревертаза (MMIv)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
<b>ПКО кДНК <i>HDV</i>-FL</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
<b>Буфер для элюции</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

<sup>3</sup> При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов рассчитан на проведение 112 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 4.

**К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
<b>ПКО HDV-rec</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
<b>ВКО ICZ-rec</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

**ВНИМАНИЕ!** Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в **приложении 1**. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-сорб»** порядок работы см. в **приложении 2**. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»».
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы для экстракции РНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в **приложении 3**. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»».

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот компаний bioMérieux и Qiagen совместно с набором реагентов необходимо использование протоколов и реагентов, позволяющих проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура экстракции проводится в соответствии с инструкцией к автоматическим станциям, а также с учетом следующих условий:

- а) Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну пробу.
- б) При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
- в) Программируемый объем элюции – 50-60 мкл (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).
- г) При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) обязательно использование дополнительного комплекта реагентов «EM-плюс» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Допускается использование режимов лизиса в приборе (**On-board**) и вне прибора (**Off-board**).
- д) После окончания экстракции РНК извлечь пробирки из прибора и провести реакцию ОТ-ПЦР. Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HBV-FL».

## **ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ**

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

**ВНИМАНИЕ!** При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

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

**Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.**

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

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 1).

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации на 0,2 мл или на 0,5 мл с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (два контроля экстракции, один контроль амплификации) и пробирок «Фон». Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HDV, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и 0,25 мкл RT-G-mix-2 (см. также табл. 1, пункт А).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Добавить в две пробирки «Фон» по **15 мкл приготовленной смеси** (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)) и по

**10 мкл буфера для элюции**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

**ВНИМАНИЕ!** После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить из расчета на 1 пробу **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)** (см. также табл. 1, пункт А). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

6. **В случае повторного использования образцов «Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HDV**, **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)** (см. также табл. 1, пункт Б). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

7. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

8. В готовые пробирки внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических образцов.

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» и NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

9. Поставить **контрольные реакции**:

а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца

ПКО *HDV*-рес.

- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *HDV-FL***.

При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с готовой реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

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

**Схема приготовления реакционных смесей для формата FEP  
А. Если пробирки «ФОН» готовятся**

		<b>Этап 1. Смесь из трех компонентов.</b> Объем реактивов на указанное кол-во образцов с учетом контрольных точек и 2 образцов «Фон» (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы MMIV, учтен запас на один образец (мкл)			<b>Этап 2. Внесение ферментов.</b> Кол-во добавляемых ферментов на указанное кол-во образцов после отбора смеси на 2 образца «Фон» (мкл)	
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек <sup>4</sup>	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HDV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераз а (TaqF)	ТМ-Реввертаза (MMIV)
6	9	120	60	3,0	5,0	2,5
10 <sup>5</sup>	13	160	80	4,0	7,0	3,5
22 <sup>6</sup>	25	280	140	7,0	13,0	6,5
34	37	400	200	10,0	19,0	9,5
46	49	520	260	13,0	25,0	12,5

**ВНИМАНИЕ!** Количество добавляемых полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы (MMIV) рассчитано за вычетом двух пробирок «Фон».

**Б. Если используются ранее приготовленные пробирки «ФОН»<sup>7</sup>**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HDV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераз а (TaqF)	ТМ-Реввертаза (MMIV)
6	9	100	50	2,5	5,0	2,5
10	13	140	70	3,5	7,0	3,5
22	25	260	130	6,5	13,0	6,5
34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

<sup>4</sup> Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов)

<sup>5</sup> Панель из 12 пробирок на экстракцию

<sup>6</sup> Панель из 24 пробирок на экстракцию

<sup>7</sup> Допускается повторное исследование пробирок «ФОН» при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок

## Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл. 2). Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы.

Таблица 2

**Программа амплификации**

Для амплификаторов с активным регулированием <sup>8</sup>				Для амплификаторов с матричным регулированием <sup>9</sup>			
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	2	95	15 мин	1
3	95	2 с	45	3	95	10 с	45
	60	10 с			60	15 с	
					72	15 с	
4	10	Хранение		4	10	Хранение	

2. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

## **ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»**

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к соответствующему прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК HDV.

**ВНИМАНИЕ!** До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ

<sup>8</sup> Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research), МахуGene (Axygen), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) и аналогичные.

<sup>9</sup> Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra) и аналогичные.

## ФОРМАТ FEP

---

Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HBV-FL».

## **ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и РНК-проб, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- значения менее установленного порогового значения отрицательного результата принимаются отрицательными, более установленного порогового значения положительного результата – положительными, между порогами – сомнительными.
- положительный результат по каналу HEX/Yellow свидетельствует о наличии в пробе РНК *HDV*.
- результат исследования невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения отрицательного результата, и сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения.
- при получении сомнительного результата детекции, требуется повторное проведение ПЦР-исследования данной пробы.

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции, в соответствии с табл. 3.**

Таблица 3

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

<b>Контроль</b>	<b>Контролируемый этап ПЦР-исследования</b>	<b>Результат автоматической интерпретации</b>
OK	Экстракция РНК, ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – отрицательный
ПК	Экстракция РНК, ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – положительный
K+	ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – положительный
K–	ПЦР	FAM/Green – отрицательный HEX/Yellow – отрицательный

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля экстракции (ПК) или положительного контроля ПЦР (К+) по каналу HEX/Yellow получен сигнал ниже порогового значения положительного результата необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HDV*, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу HEX/Yellow выше порогового значения положительного результата необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HDV*, начиная с этапа экстракции РНК.

**ФОРМАТ FRT  
СОСТАВ**

**Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>10</sup>	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 1 в количестве 2-х шт.

**Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>10</sup>	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>10</sup>	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 2 в количестве 2-х шт.

<sup>10</sup> При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

**Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>Лизирующий раствор МАГНО-сорб</b>	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>11</sup>	70	4 флакона
<b>Компонент А</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
<b>Раствор для отмывки 5</b>	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>11</sup>	60	4 флакона
<b>Раствор для отмывки 6</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
<b>Раствор для отмывки 7</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
<b>Магнетизированная силика</b>	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
<b>Буфер для элюции</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. Входит в состав формы комплектации 3.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита D (HDV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>RT-G-mix-2</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
<b>ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HDV</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
<b>ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
<b>Полимераза (TaqF)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
<b>ТМ-Ревертаза (MMIv)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
<b>ПКО кДНК HDV-FL</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
<b>Буфер для элюции</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

<sup>11</sup> При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов рассчитан на проведение 112 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 4.

**К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
<b>ПКО HDV-rec</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
<b>ВКО ICZ-rec</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

**ВНИМАНИЕ!** Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-преп**» порядок работы см. в **приложении 1**. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-сорб**» порядок работы см. в **приложении 2**. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб».
- при использовании комплекта реагентов «**МАГНО-сорб**» порядок работы для экстракции РНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в **приложении 3**. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот компаний bioMérieux и Qiagen совместно с набором реагентов необходимо использование протоколов и реагентов, позволяющих проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура экстракции проводится в соответствии с инструкцией к автоматическим станциям, а также с учетом следующих условий:

- а) Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор до начала экстракции в объёме 10 мкл на одну пробу.
- б) При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
- в) Программируемый объем элюции – 50-60 мкл (допускается увеличение объёма элюции до 100 мкл).
- г) При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) обязательно использование дополнительного комплекта реагентов «EM-плюс» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Допускается использование режимов лизиса в приборе (**On-board**) и вне прибора (**Off-board**).
- д) После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора и провести реакцию ОТ-ПЦР. Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс<sup>®</sup> HBV-FL».

**ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

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

**ВНИМАНИЕ!** При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

**А. Подготовка пробирок для амплификации**

**Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.**

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

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 4).

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (два контроля экстракции, один контроль амплификации). Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HDV, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, 0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMiv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В готовые пробирки внести по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из клинических образцов.

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» и NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить **контрольные реакции**:
  - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца

ПКО *HDV*-rec.

- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *HDV-FL***.

При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с готовой реакционной смесью внести **10 мкл буфера для элюции**.

**Таблица 4**

**Схема приготовления реакционных смесей для формата FRT**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом на один образец				
		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек <sup>12</sup>	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL <i>HDV</i>	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
4	7	80	40	2,0	4,0	2,0
6 <sup>13</sup>	9	100	50	2,5	5,0	2,5
8	11	120	60	3,0	6,0	3,0
10 <sup>14</sup>	13	140	70	3,5	7,0	3,5
12	15	160	80	4,0	8,0	4,0
14 <sup>15</sup>	17	180	90	4,5	9,0	4,5
16	19	200	100	5,0	10,0	5,0
18	21	220	110	5,5	11,0	5,5
20	23	240	120	6,0	12,0	6,0
22 <sup>16</sup>	25	260	130	6,5	13,0	6,5
34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
2. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой

<sup>12</sup> Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов)

<sup>13</sup> Экстракция одного стрипа на приборе NucliSENS easyMAG (8 пробирок)

<sup>14</sup> Панель из 12 пробирок на экстракцию

<sup>15</sup> Экстракция двух стрипов на приборе NucliSENS easyMAG (16 пробирок)

<sup>16</sup> Панель из 24 пробирок на экстракцию, экстракция трех стрипов на приборе NucliSENS easyMAG

детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6).

**Таблица 5.**

**Программа «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа<sup>17</sup>**

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удерж. темп-ры	50	15 мин	–	1
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

<sup>17</sup> Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия)

**Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов  
планшетного типа<sup>18</sup>**

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

### **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *HDV*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или

<sup>18</sup> Например, iCycler iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла  $Ct$  в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, *отрицательным* в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения  $Ct$  или  $Cp$ ), *сомнительным* во всех других случаях.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- образец считается **положительным** по содержанию РНК *HDV*, если на канале JOE/HEX/Yellow получено значение порогового цикла  $Ct$ , не превышающее указанное (граничное) значение.
- образец считается **отрицательным** по содержанию РНК *HDV*, если на канале JOE/HEX/Yellow отсутствует значение  $Ct$  или получено значение  $Ct$  более указанного (граничного) значения, а по каналу ВКО для него определено значение порогового цикла  $Ct$ , не превышающее указанное (граничное) значение.
- образец считается **сомнительным** в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуется повторное ПЦР-исследование соответствующего образца.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения  $Ct$  указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального времени» и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*) «АмплиСенс® *HCV-FL*», РНК вируса гепатита D (*HDV*) «АмплиСенс® *HDV-FL*», РНК вируса гепатита G (*HGV*) «АмплиСенс® *HGV-FL*», ДНК вируса гепатита В (*HBV*) «АмплиСенс® *HBV-FL*».

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 7).

Таблица 7

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат амплификации по каналу	
		FAM/Green	JOE/HEX/Yellow
OK	Экстракция РНК, ПЦР	положительный	отрицательный
ПК	Экстракция РНК, ПЦР	положительный	положительный
К+	ПЦР	положительный	положительный
К-	ПЦР	отрицательный	отрицательный

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля экстракции (ПК) или положительного контроля ПЦР (К+) по каналу JOE/HEX/Yellow значение *Ct* отсутствует или превышает указанное (граничное) значение, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HDV*, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу JOE/HEX/Yellow получено значение *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HDV*, начиная с этапа экстракции РНК.

## СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

**Хранение.** Комплекты реагентов «РИБО-сорб» и «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание ПКО кДНК *HDV-FL*, ПКО *HDV-rec* и ВКО *ICZ-rec* более двух раз, после размораживания ПКО кДНК *HDV-FL*, ПКО *HDV-rec* и ВКО *ICZ-rec* хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 месяцев. ОТ-ПЦР-смесь-1-FL *HDV* хранить в защищенном от света месте.

**Условия отпуска.** Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *HDV-FL*» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: [products@pcr.ru](mailto:products@pcr.ru))<sup>19</sup>.

---

<sup>19</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации



### ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

#### Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ICZ-rec**.
4. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **раствора для лизиса и ВКО** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО) с последующим разнесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, ДНК *HBV*, РНК *HGV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О HDV-rec**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли

жидкости с крышки.

9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 5 мин.
11. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
16. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
17. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
20. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес, или не выше минус 68 °C в течение года.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»

#### Порядок работы

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ICZ-rec**.
4. В пробирки внести по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **лизирующего раствора и ВКО** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим разнесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, ДНК *HBV*, РНК *HGV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО HDV-rec**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с

температурой 60 °С на 10 мин. Осадить на центрифуге для сброса капель конденсата с крышки.

9. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
10. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g (например, 10000 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
12. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать раствор для отмывки 3 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
15. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Полностью отобрать раствор для отмывки 4 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
16. Высушить сорбент, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °С на 10 мин.
17. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл РНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °С 5 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК**

---

2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года. При появлении признаков взмучивания сорбента необходимо вновь осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g в течение 1 мин.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»****А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы****Порядок работы**

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции РНК из 24 образцов:
  - а) во флакон с лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл) внести 0,28 мл ВКО ICZ-гес, все содержимое пробирки с компонентом А (0,6 мл) и все содержимое пробирки с магнетизированной силикой (0,9 мл).

Примечание – При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, ДНК HBV, РНК HGV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

- б) закрыть крышку флакона и **аккуратно** перемешать переворачиванием 5-7 раз, избегая образования пены.
  - в) внести в пробирки на 5 мл по 2,6 мл подготовленной смеси лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО, компонента А и магнетизированной силики.
4. При экстракции РНК менее чем из 24 образцов:
  - а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл ВКО ICZ-гес, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку 10 мкл ВКО ICZ-гес, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО ICZ-гес, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

Примечание – При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, ДНК *HBV*, РНК *HGV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

- б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО *ICZ*-рес, компонента А и магнетизированной силики.
- в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл исследуемого образца плазмы** и перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О *HDV*-рес**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**.
10. Используя наконечники без фильтра на 1000 мкл, осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
13. Ресуспендировать магнетизированную силику со стенок осторожным вортиксированием, а затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать

## ЭКСТРАКЦИЯ РНК

---

**2 мин.**

15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Добавить **700 мкл раствора для отмывки 5**, ресуспендировать магнетизированную силику, и повторить пп. 14-15.
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем коротко осадить капли на вортексе.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
21. Добавить **70 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК.

**ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.**

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

### **Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы**

#### **Порядок работы**

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО**

## ЭКСТРАКЦИЯ РНК

**ICZ-рес, компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО ICZ-рес, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО ICZ-рес, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

Примечание – При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, ДНК HBV, РНК HGV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

- Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО ICZ-рес, компонента А и магнетизированной силики.
- Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
- Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **200 мкл исследуемого образца плазмы** и перемешать на вортексе.
- Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО HDV-рес**, перемешать на вортексе.
- Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе.
- Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
- Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
- Осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надсадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
- Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.

Формат FEP Форма 4: **REF** V3-FEP; **REF** H-1784-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-V3(RG,iQ,Mx,Dt);

**REF** H-1784-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 46 из 48

13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**
15. Отобратить надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6.**
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобратить надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
21. Добавить **70 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК.

**ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.**

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес, или не выше минус 68 °C в течение года.

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для in vitro диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель