

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 10.04.2012 № 1671-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 ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® HBV-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.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ФОРМАТ FEP	12
СОСТАВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	15
А. Подготовка пробирок для амплификации	16
Б. Проведение амплификации	19
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	20
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	20
ФОРМАТ FRT	22
СОСТАВ	22
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	24
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	24
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	25
А. Подготовка пробирок для амплификации	26
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	27
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	29
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп».....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- сорб».....	35
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- сорб».....	38
А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы.....	38
Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы.....	40
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	43

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
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
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® *HBV-FL*» предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы крови.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из плазмы крови совместно с ВКО и проведении амплификации ДНК 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 ДНК *HBV*. Положительный контрольный образец этапа экстракции ПКО-1-*HBV* детектируется по каналам соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE

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

(HBV). Контрольный образец амплификации – KB2 HBV является комплексным для HBV и ВКО и аналогично детектируется по каналам соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (HBV).

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, включающего экстракцию ДНК из клинического материала методом преципитации и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала магнитной сепарацией и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 4 предназначена для амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV5-S-FEP; [REF](#) HK2-0302-2; Форма 4: [REF](#) V5-FEP; [REF](#) H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0302-1;

Форма 4: [REF](#) R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0304-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 4 из 43

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 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, включающего экстракцию ДНК из клинического материала методом преципитации и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала магнитной сепарацией и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для амплификации ДНК с гибридизационно-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	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность, МЕ/мл
Формат FEP	100	«РИБО-сорб» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	200
	200	«МАГНО-сорб»	100
	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	20
Формат FRT	100	«РИБО-сорб»	100
		«РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	50
	200	«МАГНО-сорб»	50
	1000	«МАГНО-сорб»	10
		NucliSENS easyMAG	5

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной РНК/ДНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита D, 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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 6 из 43

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 8 из 43

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:

11. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
12. 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)).
13. 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 гибридизационно-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.

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV5-S-FEP; [REF](#) HK2-0302-2; Форма 4: [REF](#) V5-FEP; [REF](#) H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0302-1;

Форма 4: [REF](#) R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0304-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 9 из 43

7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

8. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP:

9. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axygen, США) или аналогичные).

10. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), «Джин» (версия п.о. не ниже 4.4i) («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT:

11. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000 или 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 3 % раствором ЭДТА из расчета 1:20

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV5-S-FEP; [REF](#) НК2-0302-2; Форма 4: [REF](#) V5-FEP; [REF](#) Н-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) НК2-0302-1;

Форма 4: [REF](#) R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) Н-0304-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 10 из 43

(ЭДТА : кровь). 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 г. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

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
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 ²	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 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 ²	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ²	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 шт.

² 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.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 12 из 43

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>
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ³	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость ³	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	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 амплификации ДНК вируса гепатита В (HBV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
KB2 HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

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

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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 13 из 43

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1-<i>HBV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот компаний bioMérieux и Qiagen совместно с набором реагентов необходимо применение протоколов и реагентов, позволяющих проводить экстракцию РНК/ДНК 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 экстракции 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 применение 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 ДНК извлечь пробирки из прибора и провести реакцию амплификации. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение года.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления Р 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».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК 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 ДНК 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 ПЦР-смеси-1-FL *HBV* и 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT (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 по **10 мкл буфера для элюции**, перемешать пипетированием. Сверху добавить по

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 16 из 43

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 пробирок для ПЦР.

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить из расчета на 1 пробу **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** (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), 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 ПЦР-смеси-1-FL HBV**, **5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** (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 проб ДНК**, выделенных из клинических образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, 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 пробы ДНК**, выделенной из образца ПКО-1-*HBV*.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.

в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл KB2 HBV**.

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).

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей для формата FEP

А. Если пробирки «ФОН» готовятся

		Этап 1. Смесью из двух компонентов. Объем реактивов на указанное кол-во образцов с учетом контрольных точек и 2 образцов «Фон» (без полимеразы (TaqF), учтен запас на один образец (мкл))		Этап 2. Внесение ферментов. Кол-во добавляемого фермента на указанное кол-во образцов после отбора смеси на 2 образца «Фон» (мкл)
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ⁴	ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i>	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
6	9	120	60	5,0
10 ⁵	13	160	80	7,0
22 ⁶	25	280	140	13,0
34	37	400	200	19,0
46	49	520	260	25,0

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемой полимеразы (TaqF) рассчитано за вычетом двух пробирок «Фон».

⁴ Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции ДНК + 1 контроль ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов).

⁵ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию.

Формат FEP Форма 2: [REF] TV5-S-FEP; [REF] HK2-0302-2; Форма 4: [REF] V5-FEP; [REF] H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF] TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0302-1;

Форма 4: [REF] R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0304-1 / [VER] 15.02.12 / стр. 18 из 43

Б. Если используются ранее приготовленные пробирки «ФОН»⁷

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек	ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i>	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
6	9	100	50	5,0
10	13	140	70	7,0
22	25	260	130	13,0
34	37	380	190	19,0
46	49	500	250	25,0

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 ⁸				Для амплификаторов с матричным регулированием ⁹			
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	

ВНИМАНИЕ! Цикл 1 (50 °С – 30 мин) включается при необходимости, если проводится одновременная амплификация совместно с тестами для выявления РНК *HCV*, РНК *HDV*, РНК *HGV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования.

2. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

⁷ Допускается повторное исследование пробирок «ФОН» при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа пробирок для ПЦР.

⁸ Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), Gradient Palm Cyler (Corbett Research), МахуGene (Ахуген), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

⁹ Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra).

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 19 из 43

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 ДНК ВКО.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК *HBV*.

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 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*».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, 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 ДНК *HBV*.
- результат исследования невалидный, если для данной

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 20 из 43

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 положительного и отрицательного контролей, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат автоматической интерпретации
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – отрицательный
ПК	Экстракция ДНК, 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 этапа экстракции (ПК) или положительного контроля этапа ПЦР (K+) по каналу HEX/Yellow получен сигнал ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *HBV*, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу HEX/Yellow выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *HBV*, начиная с этапа экстракции ДНК.

**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 ¹⁰	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 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 ¹⁰	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ¹⁰	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 шт.

¹⁰ 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.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 22 из 43

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>
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ¹¹	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ¹¹	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	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 амплификации ДНК вируса гепатита В (HBV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
KB2 HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

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

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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 23 из 43

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1-НВУ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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

- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в приложении 1. «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-сорб»** порядок работы см. в приложении 2. «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб».
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы для экстракции ДНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в приложении 3. «Экстракция ДНК 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/ДНК 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 ДНК, извлечь пробирки из прибора и провести реакцию амплификации. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение года.

Также см. 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».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 25 из 43

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 ДНК 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 ПЦР-смеси-1-FL HBV, 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. 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 проб ДНК**, выделенных из клинических образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, 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** пробы ДНК, выделенной из образца ПК0-1-*HBV*.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы ДНК, выделенной из образца ОК0.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл KB2 HBV**.

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	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ¹²	ПЦР-смесь-1-FL <i>HBV</i>	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
4	7	80	40	4,0
6 ¹³	9	100	50	5,0
8	11	120	60	6,0
10 ¹⁴	13	140	70	7,0
12	15	160	80	8,0
14 ¹⁵	17	180	90	9,0
16	19	200	100	10,0
18	21	220	110	11,0
20	23	240	120	12,0
22 ¹⁶	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.

¹² Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции ДНК + 1 контроль ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов).

¹³ Экстракция одного стрипа на приборе NucliSENS easyMAG (8 пробирок).

¹⁴ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

¹⁵ Экстракция двух стрипов на приборе NucliSENS easyMAG (16 пробирок).

¹⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию, экстракция трех стрипов на приборе NucliSENS easyMAG.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 27 из 43

2. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой 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 типа¹⁷

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во 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 *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.

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

¹⁷ Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 28 из 43

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа¹⁸

Этап	Температура, °С	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, 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.). 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.

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 используемого прибора 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 ДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *HBV*.

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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 29 из 43

Результаты интерпретируются на основании наличия (или 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 C_t 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 C_t или C_p), *сомнительным* во всех других случаях.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- образец считается **положительным** по содержанию ДНК *HBV*, если на канале JOE/HEX/Yellow получено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
- образец считается **отрицательным** по содержанию ДНК *HBV*, если на канале JOE/HEX/Yellow отсутствует значение C_t или получено значение C_t более указанного (граничного) значения, а по каналу ВКО для него определено значение порогового цикла C_t , 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 C_t 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/Yellow
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	положительный	отрицательный
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	положительный	положительный
К+	ПЦР	положительный	положительный
К-	ПЦР	отрицательный	отрицательный

ВНИМАНИЕ!

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

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. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплекты реагентов «РИБО-сорб» и «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °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.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *HBV-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)¹⁹.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»



Е.Л.Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

¹⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Формат FEP Форма 2: [REF] TV5-S-FEP; [REF] НК2-0302-2; Форма 4: [REF] V5-FEP; [REF] Н-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF] TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] НК2-0302-1;

Форма 4: [REF] R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] Н-0304-1 / [VER] 15.02.12 / стр. 32 из 43

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК 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 STI-87**.
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*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, 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 ПКО-1-HBV**, 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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 33 из 43

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- 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 и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C или в течение года при температуре не выше минус 16 °C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция ДНК 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 STI-87**.
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*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, 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-1-HBV**, 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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

(например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

Очищенная ДНК может 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 и хранить при температуре не выше минус 16 °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 ДНК 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 ДНК из 24 образцов:
 - а) во флакон с лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл) внести 0,28 мл ВКО STI-87, 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, РНК HGV, ДНК HBV, 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 ДНК менее чем из 24 образцов:
 - а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл ВКО STI-87, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-87, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО STI-87, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

Формат FEP Форма 2: [REF] TV5-S-FEP; [REF] HK2-0302-2; Форма 4: [REF] V5-FEP; [REF] H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF] TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] HK2-0302-1;

Форма 4: [REF] R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF] H-0304-1 / [VER] 15.02.12 / стр. 38 из 43

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

Примечание – 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).

- б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО STI-87, 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 ПКО-1-HBV**, 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 надсадочную 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

Формат FEP Форма 2: **REF** TV5-S-FEP; **REF** HK2-0302-2; Форма 4: **REF** V5-FEP; **REF** H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0302-1;

Форма 4: **REF** R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0304-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 39 из 43

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- 1,5 мл.
14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать **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 °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 и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для проведения ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед 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 года.

Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °C до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV5-S-FEP; [REF](#) HK2-0302-2; Форма 4: [REF](#) V5-FEP; [REF](#) H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0302-1;

Форма 4: [REF](#) R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0304-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 40 из 43

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО STI-87, компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-87, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО STI-87, 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*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО STI-87, компонента А и магнетизированной силики.
5. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **200 мкл исследуемого образца плазмы** и перемешать на вортексе.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**, перемешать на вортексе.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
10. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
11. Осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надсадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV5-S-FEP; [REF](#) HK2-0302-2; Форма 4: [REF](#) V5-FEP; [REF](#) H-0304-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V5-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0302-1;

Форма 4: [REF](#) R-V5-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0304-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 41 из 43

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.
13. Смыть магнетизированную силику вортиксированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
15. Отобрать 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 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 °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 и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК для проведения ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться в течение **1 нед** 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 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		