

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

«12» августа 2015 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для определения РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека  
типа 1 (ВИЧ-1) в биологическом материале методом  
полимеразной цепной реакции (ПЦР)

**«АмплиСенс® ВИЧ-С-FL»**

**АмплиСенс®**



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



## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....                                                                                             | 3  |
| НАЗНАЧЕНИЕ .....                                                                                                    | 3  |
| ПРИНЦИП МЕТОДА .....                                                                                                | 4  |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ .....                                                                      | 5  |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....                                                                                  | 6  |
| ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....                                                                                | 7  |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....                                                                                         | 7  |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....                                                                       | 10 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..                                                      | 12 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК .....                                                        | 12 |
| ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ<br>ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....                        | 13 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....                                                                                   | 13 |
| ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....                                                                    | 13 |
| ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT) .....                                                             | 15 |
| СОСТАВ .....                                                                                                        | 15 |
| РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК/кДНК С<br>ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....         | 15 |
| А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР .....                                                                             | 16 |
| Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» .....                                                 | 17 |
| В. Анализ и интерпретация результатов .....                                                                         | 18 |
| ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 (комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit, «ПЦР-<br>комплект» вариант FRT – 2 штуки) ..... | 21 |
| СОСТАВ .....                                                                                                        | 21 |
| РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК/кДНК С<br>ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....         | 22 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации .....                                                                       | 22 |
| Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» .....                                                 | 23 |
| В. Анализ и интерпретация результатов .....                                                                         | 24 |
| СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ .....                                                           | 28 |
| ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....                                                                       | 28 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ .....                                                                    | 30 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....                                                                                                  | 31 |

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|                                                |                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ВИЧ-1                                          | - вирус иммунодефицита человека типа 1                                                                                                                                                       |
| ВКО ВИЧ-М-FRT                                  | - экзогенный внутренний контрольный образец                                                                                                                                                  |
| ДНК                                            | - дезоксирибонуклеиновая кислота                                                                                                                                                             |
| кДНК                                           | - Комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК                                                                                                             |
| К-                                             | - отрицательный контроль ОТ-ПЦР                                                                                                                                                              |
| ОК                                             | - отрицательный контроль экстракции                                                                                                                                                          |
| ОКО                                            | - отрицательный контрольный образец                                                                                                                                                          |
| ОТ-ПЦР                                         | - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией                                                                                                                                       |
| ПК                                             | - положительный контроль экстракции                                                                                                                                                          |
| ПКО                                            | - положительный контрольный образец                                                                                                                                                          |
| ПЦР                                            | - полимеразная цепная реакция                                                                                                                                                                |
| РНК                                            | - рибонуклеиновая кислота                                                                                                                                                                    |
| РУ                                             | - регистрационное удостоверение                                                                                                                                                              |
| ФБУН ЦНИИ<br>Эпидемиологии<br>Роспотребнадзора | -Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FRT                                            | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»                                                                                                                                       |

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-С-FL» предназначен для качественного определения РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в биологическом материале (очищенные сперматозоиды) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц, инфицированных ВИЧ, вне зависимости от стадии заболевания. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК/ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

**ВНИМАНИЕ!** В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которого лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Клиническая интерпретация результатов лабораторного исследования проводится в соответствии с действующей нормативно-методической документацией (Приказ Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «Порядок использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказания и

ограничения к их применению»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК/ДНК из образцов исследуемого материала с внутренним контрольным образцом (ВКО ВИЧ-М-FRT), проведении реакции обратной транскрипции РНК и одновременной амплификации участков ДНК/кДНК выявляемого микроорганизма и кДНК ВКО ВИЧ-М-FRT с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО ВИЧ-М-FRT позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов ПЦР на результаты исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК/ДНК проводится обратная транскрипции РНК с помощью фермента ТМ-Ревертазы и амплификации участков ДНК/кДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК/кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся две реакции – амплификация участка гена вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), а также амплификация последовательности кДНК ВКО ВИЧ-М-FRT. Результаты амплификации ДНК/кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), а также кДНК ВКО ВИЧ-М-FRT регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

| Канал для флуорофора | FAM                | JOE                                                    |
|----------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|
| ДНК/кДНК-мишень      | кДНК ВКО ВИЧ-М-FRT | ДНК/кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) |
| Область амплификации | STI-248-rec        | Регион pol                                             |

## ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 2** включает комплект реагентов для экстракции нуклеиновых кислот QIAamp Viral RNA Mini Kit, «ПЦР-комплект» вариант FRT – 2 штуки.

**Форма 3** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации ДНК/кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять РНК/ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК/ДНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации ДНК/кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и позволяет выявлять ДНК/РНК в качественном формате.

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

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

**ВНИМАНИЕ!** Пробы РНК/ДНК, полученные в результате экстракции из исследуемых образцов, амплифицируются в двух повторах.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 2

| Вид исследуемого материала       | Комплект для экстракции РНК/ДНК | Комплект для обратной транскрипции и амплификации | Аналитическая чувствительность                          |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Очищенные сперматозоиды человека | QIAamp Viral RNA Mini Kit       | «ПЦР-комплект» вариант FRT                        | 200 копий РНК ВИЧ/мл, 300 копий ДНК ВИЧ/мл <sup>1</sup> |

Данная чувствительность достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент РНК/ДНК заявленного возбудителя. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, 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*, а также геномной ДНК человека.

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

<sup>1</sup> Аналитическая чувствительность указана для каждого типа генетического материала в отдельности. Проведение анализа не позволяет дифференцировать РНК и ДНК ВИЧ-1.

Воспроизводимость и повторяемость

Таблица 3

| Вид исследуемого материала                                | Количество повторов | Коэффициент вариации CV, % |
|-----------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Разброс значений внутри одного теста                      |                     |                            |
| Очищенные сперматозоиды (выявление РНК ВИЧ)               | 30                  | 6,5                        |
| Очищенные сперматозоиды (выявление ДНК ВИЧ)               | 30                  | 2,1                        |
| Разброс значений между тестами, проведенными в разные дни |                     |                            |
| Очищенные сперматозоиды (выявление РНК ВИЧ)               | 60                  | 19,9                       |
| Очищенные сперматозоиды (выявление ДНК ВИЧ)               | 60                  | 14,3                       |

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-С-FL»

| Тип образцов                     | Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-С-FL» |               | Истинные значения |               |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|-------------------|---------------|
|                                  |                                                              |               | положительных     | отрицательных |
| Очищенные сперматозоиды человека | Всего исследовано 350 образцов                               | положительных | 200               | 0             |
|                                  |                                                              | отрицательных | 0                 | 150           |

Для определения диагностической чувствительности непосредственно перед анализом к образцам очищенных сперматозоидов, полученных от ВИЧ-негативных доноров, добавляли РНК или ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в количестве, равном аналитической чувствительности набора реагентов. По каждому типу нуклеиновой кислоты (200 копий РНК ВИЧ/мл или 300 копий ДНК ВИЧ/мл) тестировалось по 100 модельных образцов.

Для определения диагностической специфичности использовались образцы очищенных сперматозоидов, полученных от ВИЧ-негативных доноров.

**Диагностическая чувствительность** набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-С-FL» (относительная чувствительность в сравнении с истинными значениями) составляет 97,72 % с доверительной вероятностью 90 %.

**Диагностическая специфичность** набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-С-FL» (относительная специфичность в сравнении с истинными значениями) составляет 98,48 % с доверительной вероятностью 90 %.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда необходимо выполнять следующие требования:

- 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, 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 Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для

автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- 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 контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit)

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, включающих комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit)

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Предварительная подготовка исследуемого материала**

1. Среда для выделения жизнеспособных сперматозоидов (например, SupraSperm System («Система СупраСперм»), ORIGIO a/s («ОРИДЖИО а/с»), Дания).
2. Среда для приготовления сперматозоидов (например, Sperm Preparation Medium, ORIGIO a/s («ОРИДЖИО а/с»), Дания).
3. Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 15 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
6. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
7. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

### **Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов**

8. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – QIAamp Viral RNA Mini Kit (каталожный номер 52904, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) – при

работе с формой комплектации 1.

9. Этиловый спирт 96 % для подготовки промывочного буфера.
10. Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 15 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или 2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, США, или аналогичные).
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
16. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
17. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf, Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
18. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
19. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
20. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
21. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
22. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
23. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

#### **Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

24. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектom»:
  - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;

- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
25. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 100, 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
26. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл или 0,2 мл или 0,1 мл и наконечников (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
27. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
28. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
29. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
30. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), и другие рекомендованные Производителем).
31. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
32. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
33. Емкость для сброса наконечников.

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

Материалом для исследования служат очищенные сперматозоиды человека.

Допускается хранение образцов очищенных сперматозоидов:

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК/ДНК**

Образцы очищенных сперматозоидов человека не требуют предварительной подготовки. Для получения очищенных сперматозоидов в стерильную коническую пробирку на 15 мл с завинчивающейся крышкой на дно помещается 2 мл среды для выделения жизнеспособных сперматозоидов с концентрацией 80 %, сверху наслаивается такой же объем градиента 40 %, далее сверху наслаивается такой же объем эякулята. Пробирка центрифугируется при 800-1600 g в течение 20 минут. После центрифугирования на дне образуется клеточный осадок, выше – слой

градиента, над ним – слой семенной плазмы. Надосадочная жидкость вместе с градиентом аккуратно удаляется пипеткой.

Осадок помещается в свежую стерильную пробирку на 15 мл со средой для приготовления сперматозоидов в объеме от 5 до 10 мл. Осадок равномерно распределяется пипетированием во всем объеме среды. Проводится центрифугирование при 800-1600 g 10-15 минут. Надосадочная жидкость удаляется и процедура отмывки повторяется еще раз.

Осадок делится на две равные аликвоты, одна из которых используется для проведения тестирования на наличие РНК/ДНК ВИЧ методом ПЦР. Вторая аликвота криоконсервируется (при температуре не выше минус 68 °С) и может быть использована в программах вспомогательных репродуктивных технологий в случае получения отрицательного результата ПЦР-исследования.

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

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде, например, слизи может приводить к ингибированию реакции амплификации. Для контроля эффективности экстракции РНК/ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО ВИЧ-M-FRT), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО ВИЧ-M-FRT, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов реакции ПЦР.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация ДНК/кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК 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/ДНК используется комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit и другие рекомендованные Производителем, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту для экстракции. Порядок работы с комплектом реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit смотрите в **приложении 1**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта QIAamp Viral RNA Mini Kit:

Экстракция РНК/ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ВИЧ-М-FRT**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **140 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **140 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **130 мкл ОКО** и **10 мкл ПК01 ВИЧ**.

Объем элюции – **70 мкл**.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов ДНК/кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

| Реагент               | Описание                                    | Объем, мл | Количество |
|-----------------------|---------------------------------------------|-----------|------------|
| ДТТ лиофилизированный | Порошок белого цвета                        | ---       | 4 пробирки |
| ПЦР-смесь-FL ВИЧ      | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,3       | 4 пробирки |
| ПЦР-буфер-С           | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,2       | 4 пробирки |
| Полимераза (TaqF)     | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,03      | 4 пробирки |
| ТМ-Ревертаза (MMIv)   | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,01      | 4 пробирки |
| К–                    | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,2       | 4 пробирки |
| ОКО                   | Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета | 1,2       | 4 пробирки |
| ПКО1 ВИЧ              | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,1       | 4 пробирки |
| ВКО ВИЧ-М-FRT         | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,28      | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 80 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК/кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

## А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы ДНК/кДНК – 25 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Пробы РНК/ДНК, полученные в результате экстракции из исследуемых образцов, амплифицировать в двух повторах. Пробы РНК/ДНК, полученные в результате экстракции из контрольных образцов (ПКО1 ВИЧ и ОКО), амплифицировать в одном повторе.

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Для приготовления реакционной смеси на 20 реакций<sup>2</sup> в пробирку с **DTT лиофилизированным** добавить все содержимое пробирки с **ПЦР-буфером-С**, все содержимое пробирки с **ПЦР-смесью-FL ВИЧ**, все содержимое пробирки с **полимеразой (TaqF)** и все содержимое пробирки с **ТМ-Ревертазой (MMiv)**. Приготовленная смесь не хранится.

Примечание – Для приготовления реакционной смеси на меньшее количество реакций необходимо:

- в пробирку с **DTT лиофилизированным** добавить все содержимое пробирки с **ПЦР-буфером-С**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
  - в отдельной одноразовой пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **15 мкл ПЦР-смеси-FL ВИЧ**, **10 мкл ПЦР-буфера-С** и **DTT лиофилизированного**, **1,0 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,5 мкл ТМ-Ревертазы (MMiv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР ДНК/РНК исследуемых и контрольных проб.
  4. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
  5. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб** РНК/ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

<sup>2</sup> Анализ 8 исследуемых образцов в 2-х повторах, 2 контролей этапа экстракции и 1 отрицательного контроля ОТ-ПЦР (если необходимо).

6. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл пробы**, экстрагированной из ПК01 ВИЧ.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл пробы**, экстрагированной из ОК0.

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

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.

**ВНИМАНИЕ!** Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК/РНК-пробы и контролей.

**Б. Проведение ОТ-ПЦР 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. 5).

Таблица 5

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала**

| Цикл | Температура, °C | Время  | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1    | 50              | 30 мин | –                                                           | 1                 |
| 2    | 95              | 15 мин | –                                                           | 1                 |
| 3    | 95              | 20 с   | –                                                           | 5                 |
|      | 52              | 30 с   | –                                                           |                   |
|      | 72              | 30 с   | –                                                           |                   |
| 4    | 95              | 20 с   | –                                                           | 40                |
|      | 55              | 30 с   | FAM <sup>3</sup> , JOE <sup>3</sup>                         |                   |
|      | 72              | 30 с   | –                                                           |                   |

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

<sup>3</sup> Названия каналов детекции см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

В. Анализ и интерпретация результатов

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

Таблица 6

| Канал для флуорофора                                                      | FAM                | JOE                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|
| Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации | кДНК ВКО ВИЧ-M-FRT | ДНК/кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) |

Клиническая интерпретация результатов лабораторного исследования проводится в соответствии с действующей нормативно-методической документацией (Приказ Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «Порядок использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказания и ограничения к их применению»).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК/РНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

- РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) обнаружена, если, хотя бы для одного повтора исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE (ДНК/кДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла (*Ct*), и по каналу для флуорофора FAM (ВКО) определено значение *Ct*, не превышающее рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит от среднего значения *Ct* для контрольных образцов ПК01 ВИЧ и ОК0 по данному каналу). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) не обнаружена, если для обоих повторов исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE (ДНК/кДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла (*Ct*) не определено, а по каналу для флуорофора FAM (ВКО) определено значение порогового цикла (*Ct*), не превышающее рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит

от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПК01 ВИЧ и ОКО по данному каналу).

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора FAM (ВКО) значение порогового цикла ( $C_t$ ) не определено (отсутствует) или превышает рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПК01 ВИЧ и ОКО по данному каналу). Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР, в соответствии с табл. 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

#### Возможные ошибки:

- Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК, для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
  - по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). 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 для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК/кДНК, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК.

- от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПКО1 ВИЧ и ОКО по данному каналу).
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора FAM (ВКО) значение порогового цикла ( $C_t$ ) не определено (отсутствует) или превышает рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПКО1 ВИЧ и ОКО по данному каналу). Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР, в соответствии с табл. 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора ( $C_t$ ) |                              |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|
|          |                                      | FAM                                                          | JOE                          |
| ПК       | Экстракция РНК/ДНК                   | определено меньше граничного                                 | определено меньше граничного |
| ОК       | Экстракция РНК/ДНК                   | определено меньше граничного                                 | отсутствует                  |
| К–       | ОТ-ПЦР                               | отсутствует                                                  | отсутствует                  |

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК, для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
  - а) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). 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 для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК/кДНК, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК.

- б) по каналу для флуорофора FAM (ВКО) значение порогового цикла ( $C_t$ ) превышает граничное значение. Требуется повторное проведение анализа для всех образцов, начиная с этапа экстракции.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК/кДНК.
  4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

**ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 (комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit, «ПЦР-комплект» вариант FRT – 2 штуки)**

**СОСТАВ**

Комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit – комплект реагентов и расходных материалов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – **включает:**

| Реагент                             | Описание                       | Объем, мл | Количество |
|-------------------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| Лизирующий раствор AVL (Buffer AVL) | Прозрачная бесцветная жидкость | 31        | 1 флакон   |
| Промывочный буфер AW1 (Buffer AW1)  | Прозрачная бесцветная жидкость | 19        | 1 флакон   |
| Промывочный буфер AW2 (Buffer AW2)  | Прозрачная бесцветная жидкость | 13        | 1 флакон   |
| Буфер AVE (Buffer AVE)              | Прозрачная бесцветная жидкость | 2         | 3 пробирки |
| Нагрузочная РНК (Carrier RNA)       | Порошок белого цвета           | -         | 1 пробирка |

Комплект расходных материалов – комплект для экстракции РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| Расходный материал                             | Количество |
|------------------------------------------------|------------|
| Колонки с сорбентом (QIAamp Mini Spin Columns) | 50 шт.     |
| Пробирки (Collection tubes, 2 ml)              | 3 x 50 шт. |

Комплект реагентов и расходных материалов рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов ДНК/кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

| Реагент               | Описание                       | Объем, мл | Количество |
|-----------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ДТТ лиофилизированный | Порошок белого цвета           | ---       | 4 пробирки |
| ПЦР-смесь-FL ВИЧ      | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3       | 4 пробирки |
| ПЦР-буфер-С           | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2       | 4 пробирки |
| Полимераза (TaqF)     | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03      | 4 пробирки |
| ТМ-Ревертаза (MMIv)   | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01      | 4 пробирки |

| Реагент       | Описание                                    | Объем, мл | Количество |
|---------------|---------------------------------------------|-----------|------------|
| К–            | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,2       | 4 пробирки |
| ОКО           | Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета | 1,2       | 4 пробирки |
| ПКО1 ВИЧ      | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,1       | 4 пробирки |
| ВКО ВИЧ-М-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,28      | 4 пробирки |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 80 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

**РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК/кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

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

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

**А. Подготовка пробирок для амплификации**

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы ДНК/кДНК – 25 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Пробы РНК/ДНК, полученные в результате экстракции из исследуемых образцов, амплифицировать в двух повторах. Пробы РНК/ДНК, полученные в результате экстракции из контрольных образцов (ПКО1 ВИЧ и ОКО), амплифицировать в одном повторе.

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Для приготовления реакционной смеси на 20 реакций<sup>4</sup> в пробирку с ДТТ лиофилизированным добавить все содержимое пробирки с ПЦР-буфером-С, все содержимое пробирки с ПЦР-смесью-FL ВИЧ, все содержимое пробирки с полимеразой (TaqF) и все содержимое пробирки с ТМ-Ревертазой (MMIv). Приготовленная смесь не хранится.

Примечание – Для приготовления реакционной смеси на меньшее количество реакций необходимо:

<sup>4</sup> Анализ 8 исследуемых образцов в 2-х повторах, 2 контролей этапа экстракции и 1 отрицательного контроля ОТ-ПЦР (если необходимо).

- в пробирку с **ДТТ лиофилизированным** добавить все содержимое пробирки с **ПЦР-буфером-С**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
  - в отдельной одноразовой пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **15 мкл ПЦР-смеси-FL ВИЧ**, **10 мкл ПЦР-буфера-С** и **ДТТ лиофилизированного**, **1,0 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,5 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР ДНК/РНК исследуемых и контрольных проб.
  4. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
  5. Используя наконечник с фильтром, в пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб** РНК/ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

6. Поставить контрольные реакции:
  - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл пробы**, экстрагированной из ПК01 ВИЧ.
  - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл пробы**, экстрагированной из ОК0.

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

**ВНИМАНИЕ!** При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.

**ВНИМАНИЕ!** Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК/РНК-пробы и контролей.

## **Б. Проведение ОТ-ПЦР 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).

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

| Цикл | Температура, °C | Время  | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1    | 50              | 30 мин | —                                                           | 1                 |
| 2    | 95              | 15 мин | —                                                           | 1                 |
| 3    | 95              | 20 с   | —                                                           | 5                 |
|      | 52              | 30 с   | —                                                           |                   |
|      | 72              | 30 с   | —                                                           |                   |
| 4    | 95              | 20 с   | —                                                           | 40                |
|      | 55              | 30 с   | FAM <sup>5</sup> , JOE <sup>5</sup>                         |                   |
|      | 72              | 30 с   | —                                                           |                   |

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

В. Анализ и интерпретация результатов

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

Таблица 9

| Канал для флуорофора                                                      | FAM                | JOE                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|
| Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации | кДНК ВКО ВИЧ-М-FRT | ДНК/кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) |

Клиническая интерпретация результатов лабораторного исследования проводится в соответствии с действующей нормативно-методической документацией (Приказ Минздрава России №107н от 30 августа 2012 г. «Порядок использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказания и ограничения к их применению»).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет

<sup>5</sup> Названия каналов детекции см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК/РНК значения порогового цикла  $C_t$  в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

- РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) обнаружена, если, хотя бы для одного повтора исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE (ДНК/кДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), и по каналу для флуорофора FAM (ВКО) определено значение  $C_t$ , не превышающее рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПК01 ВИЧ и ОК0 по данному каналу). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна однократно пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) не обнаружена, если для обоих повторов исследуемого образца по каналу для флуорофора JOE (ДНК/кДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла ( $C_t$ ) не определено, а по каналу для флуорофора FAM (ВКО) определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), не превышающее рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПК01 ВИЧ и ОК0 по данному каналу).
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора FAM (ВКО) значение порогового цикла ( $C_t$ ) не определено (отсутствует) или превышает рассчитанное по вкладышу граничное значение (значение зависит от среднего значения  $C_t$  для контрольных образцов ПК01 ВИЧ и ОК0 по данному каналу). Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР, в соответствии с табл. 10 и и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК, для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
  - 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. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК/кДНК, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК.
  - по каналу для флуорофора FAM (ВКО) значение порогового цикла (Ct) превышает граничное значение. Требуется повторное проведение анализа для всех образцов, начиная с этапа экстракции.
- 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК/кДНК.
- Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию).

Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого 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. Комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit и «ПЦР-комплект» вариант FRT при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

### Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Не допускается замораживание / оттаивание ПКО1 ВИЧ и ВКО ВИЧ-M-FRT более двух раз, после размораживания ПКО1 ВИЧ и ВКО ВИЧ-M-FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ПЦР-смесь-FL ВИЧ хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit хранить при температуре от 15 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Не допускается замораживание / оттаивание ПКО1 ВИЧ и ВКО ВИЧ-M-FRT более двух раз, после размораживания ПКО1 ВИЧ и ВКО ВИЧ-M-FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ПЦР-смесь-FL ВИЧ хранить в защищенном от света месте.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-С-FL» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2 (тел. (495) 664-28-84, факс (495) 664-28-89, e-mail: [cs@ilslab.ru](mailto:cs@ilslab.ru))<sup>6</sup>.

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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется

<sup>6</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

*Родионова*

Е.Н. Родионова

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Уральский  
научно-исследовательский институт  
охраны материнства и младенчества»  
Минздрава России



Н.В.Башмакова

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



Производитель



Дата  
изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit

Подготовка реагентов к работе

Нагрузочная РНК (Carrier RNA) и лизирующий раствор AVL (Buffer AVL)

1. В пробирку, содержащую лиофилизированную нагрузочную РНК (Carrier RNA), добавить 310 мкл буфера AVE (Buffer AVE). Тщательно растворить нагрузочную РНК периодическим пипетированием.

**ВНИМАНИЕ!** После восстановления нагрузочную РНК (Carrier RNA) можно хранить при температуре минус 20 °С в течение года. Нагрузочную РНК не следует замораживать-размораживать более 3 раз, поэтому после восстановления рекомендуется разделить ее на аликвоты подходящего объема.

Проверить лизирующий раствор AVL (Buffer AVL) на наличие преципитата, в виде кристаллов, если он образовался, то прогреть раствор при 80 °С до полного растворения преципитата.

2. Смешать в отдельной стерильной пробирке объемом 15 мл лизирующий раствор AVL (Buffer AVL) и нагрузочную РНК (Carrier RNA) из расчета на необходимое количество образцов для одновременной экстракции РНК/ДНК, согласно расчетной таблице (см. табл. 1).

Таблица 1

Объемы лизирующего раствора AVL (Buffer AVL) и восстановленной нагрузочной РНК (Carrier RNA), необходимые для экстракции РНК/ДНК

| Количество образцов | Объем лизирующего раствора AVL, мл | Объем восстановленной нагрузочной РНК, мкл |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1                   | 0,56                               | 5,6                                        |
| 2                   | 1,12                               | 11,2                                       |
| 3                   | 1,68                               | 16,8                                       |
| 4                   | 2,24                               | 22,4                                       |
| 5                   | 2,8                                | 28,0                                       |
| 6                   | 3,36                               | 33,6                                       |
| 7                   | 3,92                               | 39,2                                       |
| 8                   | 4,48                               | 44,8                                       |
| 9                   | 5,04                               | 50,4                                       |
| 10                  | 5,6                                | 56,0                                       |
| 11                  | 6,16                               | 61,6                                       |
| 12                  | 6,72                               | 67,2                                       |
| 13                  | 7,28                               | 72,8                                       |
| 14                  | 7,84                               | 78,4                                       |
| 15                  | 8,4                                | 84,0                                       |
| 16                  | 8,96                               | 89,6                                       |
| 17                  | 9,52                               | 95,2                                       |

| Количество образцов | Объем лизирующего раствора AVL, мл | Объем восстановленной нагрузочной РНК, мкл |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| 18                  | 10,08                              | 100,8                                      |
| 19                  | 1,064                              | 106,4                                      |
| 20                  | 11,2                               | 112,0                                      |
| 21                  | 11,76                              | 117,6                                      |
| 22                  | 12,32                              | 123,2                                      |
| 23                  | 12,88                              | 128,8                                      |
| 24                  | 13,44                              | 134,4                                      |

Для большего количества образцов объемы лизирующего раствора AVL (Buffer AVL) и восстановленной нагрузочной РНК (Carrier RNA) рассчитываются следующим образом:

$$n \cdot 0,56 \text{ мл} = y \text{ мл},$$

$$y \text{ мл} \cdot 10 \text{ мкг/мкл} = z \text{ мкл},$$

где:

$n$  – количество образцов для одновременной экстракции РНК/ДНК,

$y$  – рассчитанный объем лизирующего раствора AVL (Buffer AVL),

$z$  – объем восстановленной нагрузочной РНК (Carrier RNA), которую необходимо добавить к лизирующему раствору AVL (Buffer AVL).

3. Смешать реагенты путем осторожного переворачивания пробирки 10 раз. Для предотвращения вспенивания не использовать вортекс.

**ВНИМАНИЕ!** Приготовленная смесь восстановленной нагрузочной РНК (Carrier RNA) и лизирующего раствора AVL; (Buffer AVL) может храниться в течение 48 часов с момента приготовления при температуре от 2 до 8 °С.

#### **Промывочный буфер AW1 (Buffer AW1)**

Однократно, перед первым использованием во флакон с концентрированным промывочным буфером AW1 (Buffer AW1) добавить этиловый спирт (96 %) в объеме 25 мл.

Разведенный промывочный буфер AW1 (Buffer AW1) может храниться в закрытом виде при температуре от 15 до 25 °С.

#### **Промывочный буфер AW2 (Buffer AW2)**

Однократно, перед первым использованием во флакон с концентрированным промывочным буфером AW2 (Buffer AW2) добавить этиловый спирт (96 %) в объеме 30 мл

Разведенный промывочный буфер AW2 (Buffer AW2) может храниться в закрытом виде при температуре от 15 до 25 °С.

## Процедура экстракции РНК/ДНК

**ВНИМАНИЕ!** Лизирующий раствор AVL (Buffer AVL) с нагрузочной РНК (Carrier RNA) при наличии осадка в виде кристаллов прогреть при температуре 80 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл, включая отрицательный и положительный контроли экстракции.

1. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО ВИЧ-M-FRT.
2. Добавить в пробирки по 560 мкл лизирующего раствора AVL (Buffer AVL), содержащего нагрузочную РНК (Carrier RNA). Промаркировать пробирки.
3. Внести в каждую пробирку по 140 мкл подготовленного исследуемого образца, используя наконечники с фильтром. Перемешать на вортексе в течение 15 с и осадить капли жидкости с крышки.
4. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контрольный образец и положительный контрольный образец. Для **отрицательного контроля экстракции (ОК)** в пробирку с лизирующим раствором AVL (Buffer AVL) добавить **140 мкл ОКО**. Для **положительного контроля экстракции (ПК)** в пробирку добавить **130 мкл ОКО** и **10 мкл ПК01 ВИЧ**.
5. Содержимое пробирок перемешать на вортексе в течение 15 сек, осадить капли жидкости с крышки, перенести пробирки в штатив и оставить на 10 мин.
6. Добавить в пробирки по 560 мкл этанола (96 %), перемешать на вортексе в течение 15 с и осадить капли жидкости с крышки.
7. Отобрать по 630 мкл смеси из каждой пробирки, аккуратно нанести на отдельную колонку с сорбентом, помещенную в пробирку, не смачивая обода колонки. Закрыть крышки колонок и центрифугировать при 6000 g (например, 8 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin) в течение 1 мин. После центрифугирования колонки поместить в чистые пробирки на 2 мл (входят в состав комплекта реагентов), а пробирки с фильтратом выбросить.

**ВНИМАНИЕ!** Если раствор прошел через мембрану колонки не полностью, центрифугирование повторять на максимальной скорости до тех пор, пока весь раствор не пройдет через мембрану.

8. Осторожно открыть колонки и повторить пункт 7.
9. Осторожно открыть колонки и добавить в каждую по 500 мкл промывочного буфера AW1 (Buffer AW1). Закрыть крышки колонок и центрифугировать при 6000 g (например, 8 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin) в течение 1 мин.

После центрифугирования пробирки с фильтратом выбросить, а колонки поместить в чистые пробирки на 2 мл (входят в состав комплекта реагентов).

10. Осторожно открыть колонки и добавить в каждую по 500 мкл промывочного буфера AW2 (Buffer AW2). Закрыть крышки и центрифугировать на полной скорости (20000 g; 14000 rpm) в течение 3 мин.
11. Перенести колонки в чистые пробирки на 2 мл и центрифугировать на максимальной скорости в течение 1 мин.
12. Перенести колонки в чистые пробирки объемом 2 мл. Осторожно открыть колонки, аккуратно добавить на мембрану, не допуская попадания на стенку колонки, 70 мкл буфера AVE (буфер AVE должен быть комнатной температуры). Закрыть крышку, оставить в штативе на 1 минуту и процентрифугировать при 6000 g (8000 rpm) в течение 1 мин.
13. Удалить колонки с сорбентом из пробирок. Осажденная жидкость содержит очищенные РНК/ДНК.

Пробы готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР, которую рекомендуется проводить сразу же после окончания процедуры экстракции.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 30 мин при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 месяца при температуре от минус 24 до минус 16 °С и в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено  
печатью 34 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора

  
В.В.Малеев

