

«УТВЕРЖДАЮ»

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



А.В. Горелов

« 05 » августа 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для количественного определения ДНК вируса гепатита В
(HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® HBV-Монитор-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	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	9
ФОРМАТ FRT.....	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	21
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- сорб-12»	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп»	24
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG.....	26
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- сорб»	29
А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы.....	29
Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы.....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Экстракция ДНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов.....	33
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
K+	– положительный контроль ПЦР
K–	– 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
HBV	– вирус гепатита В
HDV	– вирус гепатита D («Дельта»)
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® **HBV-Монитор-FL**» предназначен для количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». 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, проведении амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией 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. Положительные контрольные образцы этапа экстракции ПКО-1-HBV, ПКО-2-HBV детектируются по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (HBV). Контрольные образцы амплификации (ДНК-калибраторы) – KB1 HBV и KB2 HBV, а также калибратор HBV-Q (при использовании формы 5) аналогично детектируются по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО)

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

и JOE (HBV).

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», ОКО (4 пробирки), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, ОКО (4 пробирки), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, ОКО (8 пробирок), «ПЦР-комплект» вариант FRT – 2 штуки.

Форма 5 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, ОКО (4 пробирки) и «Комплект для калибровки HBV-Q».

Форма 6 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Примечание – Форма 3 удалена.

Форма комплектации 1 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 2 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 4 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 5 предназначена для проведения 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 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 6 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейный диапазон измерения набора реагентов

Вид клинического материала	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Линейный диапазон измерения, МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-сорб-12» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	150 – 100 000 000
	200	«МАГНО-сорб»	75 – 100 000 000
	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	15 – 100 000 000

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 И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического 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».

стр. 5 из 36

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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 Выделения, 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, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром³. 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

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

³ Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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 клинико-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 вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – 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.

стр. 7 из 36

При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб-12» или «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147):

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» (ПУ № ФСР 2010/07265):

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные.
8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм.
9. Автоматический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл.
10. Одноразовые наконечники до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)).

ЗОНА 2. ПЦР и гибридационно-флуоресцентная детекции продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.

3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.
9. 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.
10. 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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

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

ФОРМАТ FRT
СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-сорб-12» – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	5,8	4 пробирки
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ²	8,0	4 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	15	4 флакона
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	8,0	4 флакона
Сорбент	Суспензия белого цвета	0,4	4 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 48 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

К комплекту реагентов «РИБО-сорб-12» прилагается следующий реагент:

<i>Реагент</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

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

<i>Реагент</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.

⁴ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствор для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Входит в состав формы комплектации 2.

К комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагается следующий реагент:

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ³	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 4.

К комплекту реагентов «МАГНО-сорб» прилагается следующий реагент:

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
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

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

ФОРМАТ FRT

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
KB1 HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
KB2 HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

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

Входит в состав форм комплектации 1, 2, 5 (в количестве 1-й шт.), 4 (в количестве 2-х шт.).

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПКО-1-HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ПКО-2-HBV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

В составе формы комплектации 5 к «ПЦР-комплекту» прилагается следующий реагент:

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов «Комплект для калибровки HBV-Q» включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Кол-во
Калибратор HBV-Q	Порошок желтого цвета	—	1 пробирка
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	3 пробирки

Входит в состав формы комплектации 5.

К набору реагентов прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя программное обеспечение AmpliSens Soft Monitor FRT (в формате Microsoft® Excel) для автоматической обработки результатов.

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-сорб-12»** порядок работы см. в приложении 1. «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в приложении 2. «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция) порядок работы см. в приложении 3. «Экстракция ДНК с использованием автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG».
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы для экстракции ДНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в приложении 4. «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».
- при использовании комплектов реагентов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов, порядок работы см. в приложении 5. «Экстракция ДНК с использованием комплектов для экстракции не входящих в состав данного набора реагентов».

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы ДНК – 25 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 с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (три контроля экстракции, четыре калибратора). 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: **15 мкл ПЦР-смеси-1-FL HBV**, **10 мкл ПЦР-смеси-2-FRT** и **1,0 мкл полимеразы (TaqF)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Для 12 (стандартная панель экстракции набором «РИБО-сорб-12») – 16 (экстракция с использованием двух картриджей EasyMag) образцов после экстракции рекомендуется готовить реакционную смесь на 20 реакций, для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL HBV** добавить все содержимое пробирки с **ПЦР-смесью-2-FRT** и все содержимое пробирки с **полимеразой (TaqF)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Приготовленная смесь не хранится.

4. Внести в пробирки по 25 мкл готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В готовые пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, выделенных из клинических образцов. **Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.**

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб-12», «МАГНО-сорб» и NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить **контрольные реакции:**

- а) **положительный контроль экстракции (ПК-1)** – внести в пробирку **25 мкл пробы ДНК**, выделенной из образца ПКО-1-*HBV*.
- б) **положительный контроль экстракции (ПК-2)** – внести в пробирку **25 мкл пробы ДНК**, выделенной из образца ПКО-2-*HBV*.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **25 мкл ДНК-пробы**, выделенной из образца ОКО.
- г) **положительный контроль ПЦР (K₊₁)** – внести в две пробирки по **25 мкл KB1 *HBV***.
- д) **положительный контроль ПЦР (K₊₂)** – внести в две пробирки по **25 мкл KB2 *HBV***.

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

При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K₋). Для этого в пробирку с готовой реакционной смесью внести **25 мкл буфера для элюции**.

Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагента на одну реакцию (мкл)			Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом		
			15.00	10.00	1.00
Число клинических образцов	Число экстрагируемых образцов ⁶	Число исследуемых точек в ПЦР ⁷	ПЦР-смесь-1-FL HBV	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
3	6	10	165	110	11
4	7	11	180	120	12
5	8 ⁸	12	195	130	13
6	9	13	210	140	14
7	10	14	225	150	15
8	11	15	240	160	16
9	12 ⁹	16	255	170	17
10	13	17	270	180	18
11	14	18	285	190	19
12	15	19	Все содержимое пробирки	Все содержимое пробирки	Все содержимое пробирки
13	16 ¹⁰	20	Все содержимое пробирки	Все содержимое пробирки	Все содержимое пробирки

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
2. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 2, 3).

⁶ Число клинических образцов + 3 контроля этапа экстракции ДНК (N+3, N - количество клинических образцов)

⁷ Число клинических образцов + 3 контроля этапа экстракции ДНК + 4 ДНК-калибратора (N+7, N - количество клинических образцов)

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

⁹ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

¹⁰ Экстракция двух стрипов на приборе NucliSENS easyMAG (16 пробирок)

Таблица 2

Программа «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа¹¹

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

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

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для планшетного типа¹²

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
4	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	—	

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в

¹¹ например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

¹² 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.

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

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.

На основании значений порогового цикла (C_t) (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов KB1 и KB2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК ПКО (по каналу для флуорофора JOE) и ВКО (по каналу для флуорофора FAM) в пробе ПЦР. Полученные значения используют для расчета концентрации ДНК HBV в исследуемых и контрольных образцах по формуле:

$\frac{\text{число копий ДНК HBV в ПЦР-пробе}}{\text{число копий ДНК ВКО в ПЦР-пробе}} \times \text{коэффициент A} \times \text{коэффициент B} = \text{МЕ ДНК HBV/мл плазмы}$

Коэффициент А = $\frac{100}{\text{объем экстракции, мкл}}$
--

ВНИМАНИЕ! Для положительных контролей (ПК-1 и ПК-2) расчет концентрации производится без учета коэффициента А.

Коэффициент В указывается во вкладыше к данной серии ПЦР-комплекта и не может быть использован для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий. Для **формы 5** Коэффициент В вычисляется исходя из калибровки при первой постановке набора данной серии (см. приложение 5. «Экстракция ДНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов»).

ВНИМАНИЕ! Если результат больше, чем 100 000 000 МЕ/мл, то он выдается как **результат более 100 000 000 МЕ HBV/мл**. При получении значения выше линейного диапазона образец может быть перетестирован после 10-кратного разведения; полученный результат умножают на 10. Если результат меньше, чем 150 МЕ/мл при экстракции из 100 мкл образца, меньше чем 75 МЕ/мл при экстракции из 200 мкл образца, меньше чем 15 МЕ/мл при экстракции из 1 мл образца, то он выдается как **результат менее 150, менее 75, менее 15 МЕ HBV/мл** (соответственно).

Примечание – В случае необходимости получения результатов в единицах копий/мл, результаты, измеренные в Международных Единицах измерения (МЕ/мл) необходимо умножить на 1,70 (т.е. 1 МЕ=1,70 копий, 1 копия=0,59 МЕ).

ВНИМАНИЕ! Граничные значения концентрации ВКО указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в реальном времени и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 4).

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 (концентрация ВКО больше граничной)	отрицательный
ПК-1	Экстракция ДНК, ПЦР	положительный (концентрация ВКО больше граничной)	положительный Должен уложиться в диапазон во вкладыше по результатам расчетов через ВКО копий/мл
ПК-2	Экстракция ДНК, ПЦР	положительный (концентрация ВКО больше граничной)	положительный Должен уложиться в диапазон во вкладыше по результатам расчетов через ВКО копий/мл
K+ ₁	ПЦР	положительный	положительный
K+ ₂	ПЦР	положительный	положительный
K-	ПЦР	отрицательный	отрицательный

ВНИМАНИЕ!

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу для флуорофора JOE и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и JOE получено значение порогового цикла (Ct), необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК HBV, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если концентрация ВКО в таблице результатов по соответствующему каналу ниже граничного значения, указанного во вкладыше, требуется повторить исследование данной пробы, начиная с первого этапа анализа.
3. Если коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0.98, необходимо повторить амплификацию для всех проб.
4. Если рассчитанные концентрации ПКО-1-HBV и ПКО-2-HBV не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить исследование для всех образцов, 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 разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С, «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» и «Комплект для калибровки HBV-Q» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание ПКO-1-HBV, ПКO-2-HBV, KB1 HBV, KB2 HBV и BKO STI-87 более двух раз, после размораживания ПКO-1-HBV, ПКO-2-HBV, KB1 HBV, KB2 HBV и BKO 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.

Реагент ОКО, прилагающийся к комплектам реагентов «РИБО-сорб-12» и «РИБО-преп», хранить при температуре от 2 до 8 °С. Реагент ОКО, прилагающийся к комплекту реагентов «МАГНО-сорб», хранить при температуре от 2 до 25 °С. Реагент ОКО, прилагающийся к «ПЦР-комплекту» в составе формы 5, хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-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 (e-mail: cs@pcr.ru)¹¹.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Родионова

Е.Н. Родионова

Главный врач
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

¹¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12»

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 лизирующего раствора и 10 мкл ВКО) с последующим разнесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

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 **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-HBV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-2-HBV**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (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**.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

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 **500 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 **500 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 °C на 10 мин.
17. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл ДНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °C 5 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

Очищенная 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. При появлении признаков взмучивания сорбента необходимо вновь осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g в течение 1 мин.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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.

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 **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-HBV**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 5 мин.
11. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

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 очищенную 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 3

Экстракция ДНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG

Порядок работы.

А. Экстракция ДНК из образца объемом 100 мкл и лизис образца вне прибора.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность экстракции ДНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing – No, On-board Lysis Incubation – No**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В ячейки картриджа, предназначенные для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, внести по **450 мкл смеси буфера для лизиса NucliSens**.
6. В каждую ячейку добавить **100 мкл исследуемой плазмы** отдельным наконечником с фильтром, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК-1 с буфером для лизиса NucliSens, добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**, в ячейку, предназначенную для ПК-2 с буфером для лизиса NucliSens, добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-HBV**, тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК с буфером для лизиса NucliSens, добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
9. Оставить картридж с образцами на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
10. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО STI-87 одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 5).

Количество образцов для экстракции ДНК	Количество магнитной силики NucliSens, мкл	Количество ВКО STI-87, мкл	Количество компонента А «ЕМ-плюс», мкл
1	10	10	10
8	90	90	90
16	170	170	170
24 (полная загрузка прибора)	250 (с запасом на 25 проб)	250	250

11. Добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **30 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО STI-87**. Каждую ячейку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.
12. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов вне прибора (**Off board**).
13. После окончания экстракции ДНК, извлечь картридж из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции ДНК провести ПЦР**.

Для длительного хранения препарата ДНК необходимо перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Б. Экстракция ДНК из образца объемом 100 мкл или 1 мл с автоматическим лизисом образца в приборе.

1. Поставить флакон с буфером для лизиса NucliSens в прибор.
2. В каждую ячейку картриджа, предназначенную для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить 100 мкл или 1 мл исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром.
3. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК-1, добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-HBV**, в ячейку, предназначенную для ПК-2, добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-2-HBV**.
4. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК, добавить **100 мкл ОКО**.
5. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
6. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции ДНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **100 mkl** или **1 ml**, в зависимости от объема используемого клинического материала, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции ДНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.

7. Создать новый протокол экстракции ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes**.
8. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
9. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов в приборе (**On board**).
10. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State - Idle** (приблизительно 15 мин).
11. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 5)
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **30 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО STI-87**. Тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора одноразовыми наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.
13. Запустить на приборе программу продолжения экстракции ДНК.
14. После окончания экстракции ДНК, извлечь картридж с образцами из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции ДНК провести ПЦР.

Для длительного хранения препарата ДНК необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Набор реагентов при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG позволяет работать с объемами образцов 0,1 мл или 1 мл.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

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).
 - 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

 - 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 положительные контроли (ПК-1 и ПК-2). Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-HBV**, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
 8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °C на 10 мин.
 9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин.**
 10. Используя наконечники без фильтра на 1000 мкл, осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
 11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
 12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
 13. Ресуспендировать магнетизированную силику со стенок осторожным вортексированием, а затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 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.

стр. 30 из 36

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную 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 °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.

Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы

Порядок работы.

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

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 **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HBV**, в подготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-HBV**, тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать

стр. 31 из 36

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

на вортексе.

9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °C на 10 мин.
10. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин.**
11. Осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5.**
13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**
15. 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 очищенную 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Экстракция ДНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов

Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с **формой 5** гарантируются только в случае экстракции ДНК при помощи комплектов реагентов рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL».

В случае, если коэффициент В для используемого комплекта реагентов/автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот не указан во вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL», необходимо провести калибровку самостоятельно.

Калибровка необходима для определения коэффициента В и производится при первой постановке набора данной серии. Калибровка осуществляется один раз для каждой новой серии набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» и проводится на используемом для экстракции ДНК комплекте реагентов/автоматической станции.

Для проведения калибровки необходимо при первой постановке набора реагентов данной серии провести анализ 5 дополнительных точек: дополнительный повтор ПКО-1, дополнительный повтор ПКО-2 и Калибратор HBV-Q в трех повторях.

Подготовка Калибратора HBV-Q к работе:

1. Осадить на вортексе содержимое пробирки, содержащей реагент **калибратор HBV-Q** и аккуратно открыть крышку и, избегая распыления содержимого, добавить **400 мкл растворителя Q**, используя одноразовые наконечники с фильтрами.
2. Плотно закрыть пробирку и оставить на 20 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе.
3. После полного растворения открутить содержимое пробирки **калибратор HBV-Q** на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель жидкости с крышки.

Калибровку необходимо проводить на используемом для экстракции ДНК комплекте реагентов. Процедура экстракции ДНК проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов/автоматической станции для экстракции

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

нуклеиновых кислот. Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну пробу.

В случае если экстракция ДНК проводится из 100 мкл плазмы – внести по 100 мкл растворенного Калибратора *HBV-Q* в три пробирки для экстракции нуклеиновых кислот.

В случае если экстракция ДНК проводится из прочего объема плазмы (100-1000 мкл) – внести в три пробирки, подготовленные для экстракции ДНК, по 100 мкл растворенного калибратора *HBV-Q* и довести растворителем Q объем образца до используемого объема экстракции нуклеиновых кислот (например: при экстракции из 1 мл внести 100 мкл растворенного калибратора *HBV-Q* и 900 мкл растворителя Q).

После окончания экстракции ДНК провести реакцию ПЦР в соответствии с данной инструкцией.

Средние значения концентрации по каналам FAM и JOE/HEX, полученные для трёх повторов Калибратора *HBV-Q*, использовать в количественных расчетах для определения коэффициента В по следующей формуле:

$$\text{Коэффициент В} = \frac{\text{число копий ДНК ВКО (канал FAM) в калибраторе HBV-Q}}{\text{число копий ДНК HBV (канал JOE/HEX) в калибраторе HBV-Q}} \times \text{Коэффициент С}$$

Коэффициент С указан во вкладыше к данной серии набора реагентов «АмплиСенс® *HBV-Монитор-FL*».

ВНИМАНИЕ! Вычисленное значение коэффициента В должно укладываться в диапазон, указанный во вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® *HBV-Монитор-FL*» данной серии.

Вычисленное значение коэффициента В записать во вкладыш для данной серии набора реагентов «АмплиСенс® *HBV-Монитор-FL*» и использовать для расчета концентрации ДНК *HBV* в исследуемых и контрольных образцах (см. раздел «Анализ и интерпретация результатов»).

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® *HBV-Монитор-FL*».

Значения вычисленные для ПКО-1-*HBV* и ПКО-2-*HBV* записать во вкладыш для данной серии набора реагентов «АмплиСенс® *HBV-Монитор-FL*», найти среднее значение для ПКО-1-*HBV* и среднее значение для ПКО-2-*HBV*. Установить диапазон

стр. 34 из 36

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

допустимых значений для ПКО-1-*HBV* и ПКО-2-*HBV*: от «вычисленное среднее значение»/3 до «вычисленное среднее значение»x3. Например, вычисленные значения для двух повторов ПКО-1-*HBV* = 500000 МЕ/мл и 700000 МЕ/мл, тогда среднее вычисленное значение ПКО-1-*HBV* = 600000 МЕ/мл, а диапазон допустимых значений для ПКО-1-*HBV* = 200000-1800000 МЕ/мл. Вычисленные значения диапазонов допустимых значений для ПКО-1-*HBV* и ПКО-2-*HBV* записать во вкладыш и использовать для контроля следующих постановок данной серии набора реагентов «АмплиСенс® *HBV*-Монитор-FL» (см. раздел «Анализ и интерпретация результатов» инструкции к набору реагентов «АмплиСенс® *HBV*-Монитор-FL»).

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

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 36
(приложение лист) лист 06

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 8 от 28.11.2018 г.)



«05» августа 2019 г.

А.В. Горелов