

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

«02» *сентября* 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

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

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	11
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	14
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	15
А. Подготовка проб для амплификации	15
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	17
В. Анализ и интерпретация результатов	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	25
ПРИЛОЖЕНИЕ А	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

НАЗНАЧЕНИЕ

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

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

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

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

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

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

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

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

Таблица 1

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

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 4: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Примечание – Формы 1, 2, 3 удалены.

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Таблица 2

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

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

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает ДНК *HBV*.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана посредством добавления в реакцию ДНК человека, а также геномной ДНК/РНК следующих микроорганизмов и вирусов в концентрации порядка 1×10^3 копий/мл или выше: вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус иммунодефицита человека 1 типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека 6 типа, парвовирус В19, аденовирус 2 типа, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных

микроорганизмов/вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

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

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

Таблица 3

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

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

Таблица 4

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

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

Таблица 5

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

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

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

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

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

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

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком

годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

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

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

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

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

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

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит плазма крови.

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8–1,1 мм в пробирку с 6 % раствором ЭДТА (K₂ЭДТА или K₃ЭДТА) или с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают вверх дном, чтобы кровь в пробирке

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

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы крови не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI 87), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК

ВКО STI 87, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

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

Потенциально интерферирующие вещества

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

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

Таблица 6

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

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

СОСТАВ

СОСТАВ

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

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

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

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

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

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

Объем элюции – **50 мкл**.

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

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

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

Объем исследуемого образца:

- 200 мкл;
- 1000 мкл.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

Объем элюции – **70 мкл**.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

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

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

2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL *HBV*, ПЦР-буфера-В и Полимеразы (TaqF)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовленная смесь не хранится.

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

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

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

7. Поставить контрольные реакции:

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

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

Схема приготовления реакционных смесей

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

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

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

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

2. Запустить программу амплификации:

а) либо с использованием ПО AmpliSens[®] RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens[®] *HBV* Soft.

Примечание — Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens[®] RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 и выше.

б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения

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

⁵ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

программы, указанной в табл. 8 или 9, согласно инструкции по его применению.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа⁷

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

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

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа⁸

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

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

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

Таблица 10

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

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

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

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

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

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

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

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

Возможные ошибки:

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

Хранение.

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

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Верхняя граница температурного диапазона		Дата изготовления
	Изготовитель		

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»

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

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

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

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

течение 1 мин.

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