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



_____ В.В. Малеев

«__» _____ 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL»

АмплиСенс®

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

IVD

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 10
ФОРМАТ FRT 12
СОСТАВ 12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 15
А. Подготовка пробирок для амплификации 15
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 20
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» 23
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» 26
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» 29

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВИЧ-1	- вирус иммунодефицита человека типа 1
ВКО	- внутренний контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
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
FL	- флуоресцентная детекция
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL» предназначен для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) путем амплификации специфического фрагмента провирусной ДНК методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из цельной крови человека, либо сухого пятна крови.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала и амплификацию участков провирусной ДНК и ДНК эндогенного внутреннего контроля (ВКО) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

FAM, детектируется продукт амплификации ДНК ВКО. По каналу, соответствующему флуорофору JOE, детектируется продукт амплификации провирусной ДНК ВИЧ-1.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект расходных материалов для сухих пятен крови, комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100, раствор для лизиса (2 флакона), раствор для преципитации (1 флакон), «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 100, «Гемолитик» (2 флакона), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала **(цельная кровь, сухие пятна крови)** методом преципитации и амплификацию провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и ДНК эндогенного внутреннего контроля с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала **(цельная кровь)** методом сорбции на силикагеле и амплификацию провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и ДНК эндогенного внутреннего контроля с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма 3 предназначена для проведения ПЦР-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

исследования при использовании в качестве клинического материала только образцов цельной крови.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 1, 2 и 3 рассчитаны на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Объем клинического материала, мкл	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ДНК ВИЧ-1[2]
Цельная кровь	«РИБО-преп», «ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	250	100
		«ПЦР-комплект» вариант FRT	100	250
Сухая капля крови	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	- (один круг, d=12 мм)	$1x10^3$

Аналитическая специфичность

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

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

[2] Количество геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК ВИЧ-1 в 1 мл образца клинического материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда следует 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 Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[3],

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 фильтром[4]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в 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.

[4] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор 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 материалов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

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

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из клинического материала

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (до 16000 g).
3. Вортекс.
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Автоматические дозаторы переменного объема.
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
9. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.

<u>При работе с сухими пятнами крови:</u>

13. Компостеры с диаметром 6 мм (например, Qiagen, Германия).

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.
9. Программируемый амплификатор с системой детекции

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000, (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ, 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).

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 (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – 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, Москва, 2012 г.

Для проведения анализа используются:

1. Свежая цельная кровь, взятая утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия пробирка с кровью закрывается крышкой, перемешивается переворачиванием 3-4 раза и хранится при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч.
2. Сухие пятна крови, высушенные на бумажной карточке типа 903® (например, Whatman, Германия) или аналогичной. Процедуру приготовления сухих пятен крови проводить в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO/CDS/CSR/EDC/2001.16 Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance, 2009 update). Процедура нанесения крови на бумагу: на каждого пациента должна

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

приходиться одна карточка. На каждый круг карточки наносится одна капля крови (около 50 мкл). Во время нанесения крови на бумагу необходимо чтобы капля заняла большую часть круга. Правильно заполненной карточка считается та, у которой хотя бы три круга заполнены кровью правильно. После нанесения крови на карточку, карту необходимо просушить при температуре от 18 до 25 °С в течение 4–12 ч (беречь от прямых солнечных лучей). Затем для транспортировки или хранения карточки упаковываются в пакеты типа Zip-Lock (пакеты, защищающие от повышенной влажности) вместе с осушителями (до 10 шт. на пакет). В каждый пакет рекомендуется вкладывать индикатор влажности (1 шт. на пакет). В один пакет может быть упаковано до 10 индивидуальных карточек. Высушенные и упакованные карточки при низких условиях влажности могут храниться при 2–8 °С в течение 6 мес. Карточки с сухими пятнами крови могут быть транспортированы в лабораторию в течение двух недель при комнатной температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект расходных материалов для сухих пятен крови – комплект для получения, транспортировки и хранения сухих пятен крови – **включает:**

Расходный материал	*Кол-во*
Карточка для забора крови Whatman 903	100 шт.
Пакет Zip-Lock	100 шт.
Осушитель	100 шт.

Комплект рассчитан на взятие, транспортировку и хранение проб крови от 100 пациентов. Входит в форму комплектации 2.

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

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета[5]	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Входит в состав формы комплектации 1, 2.

В составе формы 2 к комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагаются:

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета[5]	30	2 флакона
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон

Комплект реагентов в форме комплектации 1 рассчитан на

[5] При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли, в случае если в качестве клинического материала используется цельная кровь, и из 42 проб, включая контроли, в случае если в качестве клинического материала используются сухие пятна крови.
Комплект реагентов в форме комплектации 2 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли, в случае если в качестве клинического материала используется цельная кровь или сухие пятна крови.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – **включает:**

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого или розового цвета	30	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия от белого до темно-бежевого цвета	1,25	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

К комплекту реагентов «ДНК-сорб-В» прилагается:

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка

Гемолитик – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови**:**

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

Реагент рассчитан на предобработку 100 клинических образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2 (1 флакон), 3 (2 флакона).

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации провирусной ДНК

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,24	8 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	8 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	8 пробирок
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	8 пробирок

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT прилагается следующий реагент:

Реагент	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на 120 реакций, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® ДНК-ВИЧ-FL».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с комплектами реагентов описан в Приложениях 1-3 к данной инструкции:

– при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» для экстракции ДНК из цельной крови порядок работы см. в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

приложении 1 «Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».

- при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» для экстракции ДНК из сухих пятен крови порядок работы см. в **приложении 2** «Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»».
- при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» порядок работы см. в **приложении 3** «Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В».

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. Приготовить реакционную смесь на **15** реакций. Для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1-FRT ВИЧ** добавить **160 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и 16 мкл полимеразы (TaqF)**, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки. Остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! В случае необходимости анализа образцов, количество которых, включая контроли, не кратно 16, рекомендуется приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке на 1,5 мл из расчета **15 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ВИЧ, 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT** и **1 мкл полимеразы (TaqF)** на одну пробу. Смесь необходимо приготовить с запасом на 1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образец. После приготовления реакционной смеси, тщательно перемешать ее на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

3. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** готовой реакционной смеси.
4. В пробирки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтром, внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5. Для каждой панели поставить 2 контрольных реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **25 мкл ТЕ-буфера**.
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **25 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека**.

Пробирки с добавленными контрольными образцами необходимо осторожно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс ДНК-ВИЧ» (см. табл. 1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Программа «АмплиСенс ДНК-ВИЧ»

	Приборы роторного типа[6]			Приборы планшетного типа[7] (за исключение приборов фирмы «ДНК-Технология»)			Приборы фирмы «ДНК-Технология»[8]		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	20 с	5	**95**	20 с	5	**95**	20 с	5
	52	30 с		**52**	30 с		**52**	30 с	
	72	30 с		**72**	30 с		**72**	30 с	
3	**95**	20 с	40	**95**	20 с	42	**95**	5 с	42
	55	30 с детекция флуоресц. сигнала		**55**	40 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с	
	72	30 с		**72**	30 с		**55**	40 с детекция флуоресц. сигнала	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и HEX/JOE/Yellow.

3. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
4. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. 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,

[6] например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[7] например, iCycler iQ, iQ5, Mx3000P и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[8] например, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО,

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка провирусной ДНК ВИЧ-1 (ПКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК ВИЧ-1 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE (ДНК ВИЧ-1) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, и в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение.
- **ДНК ВИЧ-1 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE (ДНК ВИЧ-1) значение порогового цикла *Ct* не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение, а в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) определено значение порогового цикла *Ct* не превышающее, указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM (ВКО) значение порогового цикла *Ct* не определено (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или превышает указанное граничное значение.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, *Ct*	
		по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора FAM
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует или определено значение больше граничного
ПК	Экстракции ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если в пробе с положительным контролем экстракции ДНК (ПК) отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки при экстракции ДНК. Необходимо провести экстракцию еще раз.
2. Если в пробе с положительным контролем ПЦР (К+) отсутствует положительный сигнал по какому-либо из каналов детекции. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
3. Если для данного образца, не определено значение порогового цикла *Ct* по каналу FAM (ВКО) или получено значение *Ct*, превышающее указанное значение. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа для данного образца, начиная с этапа экстракции.
4. Если в отрицательном контроле экстракции или ПЦР (ОК, К–) определено *Ct* меньше граничного**,** значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект расходных материалов для сухих пятен крови хранить при температуре от 15 до 25 °С. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ОКО. Комплект реагентов «РИБО-преп» и ОКО из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание **ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека** более двух раз, после размораживания **ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека** хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. **ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT** и **полимеразу (TaqF)** после размораживания не хранить. ПЦР-смесь-1-FRT ВИЧ хранить в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru[9].

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется 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.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации — Е.В. Ржевская

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Изготовитель		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 0,1 мл или 0,25 мл.

Примечание **– Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из крови

1. Взять пробирки на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по **1,0 мл гемолитика** и по **0,25 мл** исследуемой цельной крови соответственно маркировке. Если исследуется кровь новорожденных детей, к **1,0 мл гемолитика** добавить **0,1 мл** крови. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе.
2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 мин.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.

Полученный осадок лейкоцитов может быть немедленно лизирован или заморожен при температуре не выше минус 16 °С на две недели, а при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

Лизис клинического материала

1. Промаркировать одну дополнительную пробирку положительного контроля (ПК) и внести в нее **5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека**.
2. Промаркировать одну дополнительную пробирку отрицательного контроля (ОК) и внести в нее **5 мкл РНК-буфера**.
3. Добавить в пробирки с лейкоцитами и в пробирки с контрольными образцами по **300 мкл раствора для лизиса**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 1 сухое пятно крови.

Примечание – **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

1. Взять пробирки на 1,5 мл для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать.
2. Взять необходимое количество заранее простерилизованных компостеров (с диаметром 6 мм).
3. Используя для каждого образца отдельный компостер выбить в соответствующие пробирки круги с сухими пятнами крови. Для получения достаточного количества материала компостером необходимо вырезать одно целое пятно крови, последовательно совершая 4-5 вырезаний.
4. Промаркировать одну дополнительную пробирку положительного контроля (ПК) и внести в нее **5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека**.
5. Промаркировать одну дополнительную пробирку отрицательного контроля (ОК) и внести в нее **5 мкл РНК-буфера**.
6. В пробирки, содержащие бумагу с сухими пятнами крови, и с контрольными образцами добавить по **700 мкл раствора для лизиса**. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе.
7. Переставить пробирки в термостат и прогреть **при 65 °С в течение 30 мин**. Во время инкубации пробирки необходимо встряхивать на вортексе каждые 8-10 мин.
8. Во время инкубации необходимо приготовить и промаркировать необходимое количество свежих пробирок на 1,5 мл для клинических образцов.
9. Вынуть из термостата пробирки и процентрифугировать их на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **10 тыс об/мин.**
10. Для клинических образцов перенести надосадочную жидкость в соответствующие промаркированные свежие пробирки.

ВНИМАНИЕ! Необходимо перенести максимальное количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

жидкости. Для этого во время отбора жидкости наконечником необходимо отжимать бумагу, находящуюся в осадке. Допустимо попадание небольшого количества бумаги вместе с отобранной жидкостью в свежие пробирки.

11. Добавить в пробирки по **600 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**
13. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
15. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
16. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
17. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
18. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
19. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
20. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
21. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
22. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 0,1 мл или 0,25 мл.

Примечание – **Лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из крови

1. Взять пробирки на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой для обработки необходимого количества проб и контролей, промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по **1,0 мл гемолитика** и по **0,25 мл** исследуемой цельной крови соответственно маркировке. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе. Если исследуется кровь новорожденных детей, к **1,0 мл гемолитика** добавить **0,1 мл** крови.
2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 3 мин, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 3 мин.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **8 тыс об/мин** в течение **2 мин.** Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.
4. К осадку добавить **0,5 мл гемолитика**, перемешать на вортексе и оставить на 3 мин.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **8 тыс об/мин** в течение **2 мин**. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.
6. Повторить отмывку лейкоцитов гемолитиком. После последней отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов).

Полученный осадок лейкоцитов может быть немедленно лизирован или заморожен при температуре не выше минус 16 °С на две недели, а при температуре не выше минус

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

68 °С на длительное время.

Лизис клинического материала

1. В каждую пробирку к осадку лейкоцитов добавить по **300 мкл лизирующего раствора**, перемешать на вортексе до полного суспендирования клеток.
2. Приготовление **положительного контроля (ПК).** В отдельную пробирку, предназначенную для положительного контроля, добавить **300 мкл лизирующего раствора**, **95 мкл ОКО** и **5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1 и ДНК человека**.
3. Приготовление **отрицательного контроля (ОК).** В отдельную пробирку, предназначенную для отрицательного контроля, добавить **300 мкл лизирующего раствора** и **5 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК.**
4. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 10 мин, перемешивая осадок каждые две минуты.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
6. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Повторить пункт 7.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 10 мин** для подсушивания сорбента универсального. При

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

этом крышки пробирок должны быть открыты.

10. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат 65 °С на 5 мин.
11. Процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru