УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 16.07.13 № 3222-Пр/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«15» ноября 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации генотипов A, B, C и D
вируса гепатита B (*HBV*) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *HBV*-генотип-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
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
ФОРМАТ FRT 9
СОСТАВ 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 10
А. Подготовка пробирок для амплификации 10
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 12
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 13
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» 17
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 19

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

В–	- отрицательный контроль экстракции
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
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
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HBV	- вирус гепатита В

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *HBV*-генотип-FL»** предназначен для выявления и дифференциации генотипов A, B, C и D вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале (плазма крови) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Данный набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения ДНК *HBV* в исследуемых образцах с помощью наборов реагентов, предназначенных как для качественного, так и для количественного определения ДНК вируса гепатита В (например, **«АмплиСенс® *HBV*-FL»** или **«АмплиСенс® *HBV*-Монитор-FL»** (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), использующих гибридизационно-флуоресцентную детекцию.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из плазмы крови и амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для анализа можно использовать образцы ДНК, экстрагированной из клинического материала, в которых на этапе обнаружения и/или количественного определения *HBV* были получены положительные результаты.

Определение генотипов A, B, C и D *HBV* проводится в одной пробирке. Набор

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

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

разработан для приборов, имеющих четыре и более канала детекции флуоресценции. В табл. 1 указаны каналы, по которым детектируются выявляемые генотипы *HBV*.

Таблица 1

Детекция по каналу для флуорофора	*Генотип HBV*
FAM	**C**
JOE	**D**
ROX	**B**
Cy5	**A**

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 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, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Объём экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	500

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между генотипами A, B, C, D, E, F, G и H вируса гепатита B при использовании высококонцентрированных рекомбинантных положительных контрольных образцов и образцов плазмы крови соответствующих генотипов *HBV*.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 всегда выполнять следующие требования:

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

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

процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы 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. Одноразовую пластиковую посуду 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.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100 (ТУ 9398-071-01897593-08) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 2.
2. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные

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

системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).

3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия).
5. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
7. Автоматические дозаторы переменного объема (от 20 до 200, от 200 до 1000 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл в штативах (например, Axygen, США).
10. Одноразовые наконечники до 200 мкл (например, Axygen, США).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 2. Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детецией в режиме «реального времени»

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
2. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл в штативах (например, Axygen, США).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

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

9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, 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 круглой (например, Axygen, США) или плоской оптически прозрачной крышкой – 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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служит плазма периферической крови. Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА). 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 g, после чего отбирают плазму и переносят в отдельную одноразовую пробирку. Хранить плазму можно не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[2]	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК генотипов A, B, C и D *HBV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT *HBV* генотипы C/D/B/A	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК *HBV* генотипы B/A	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК *HBV* генотипы C/D	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 тестов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

[2] 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

К комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов A, B, C и D вируса гепатита B (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *HBV*-генотип-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов **«РИБО-преп»** в соответствии с Приложением 1 «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».

В качестве отрицательного контроля экстракции (В–) используется реагент **ОКО**.

При использовании формы комплектации набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

10 мкл.

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

1. До начала работы разморозить все реагенты набора, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (один контроль экстракции ДНК, три контроля амплификации).
3. **Для приготовления реакционной смеси** необходимо в отдельной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *HBV* генотипы C/D/B/A, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** (см. также табл. 2).

Таблица 2

Схема приготовления реакционных смесей

		Объем реактивов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,0	5,0	0,5
Число клинических образцов	Число исследуемых точек[3]	ПЦР-смесь-1-FRT[4]	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT[4]	Полимераза (TaqF)[4]
4	8	90	45	4,5
5	9	100	50	5,0
6	10	110	55	5,5
7	11	120	60	6,0
8	12	130	65	6,5
9	13	140	70	7,0
10	14	150	75	7,5
11	15	160	80	8,0
12	16	170	85	8,5

4. Тщательно перемешать полученную реакционную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса..
5. Внести в каждую пробирку, предназначенную для проведения амплификации, по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в

[3] Число клинических образцов + 1 контроль этапа экстракции ДНК + 3 контроля ПЦР (N+4, N – количество клинических образцов).

[4] Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

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

результате экстракции из клинических образцов.

7. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО.
   б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера.**
   в) **положительный контроль ПЦР ($К+_{B/A}$)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *HBV* генотипы B/A**;
   г) **положительный контроль ПЦР ($К+_{C/D}$)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *HBV* генотипы C/D.**

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-1»** (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс-1»

	Приборы роторного типа[5]			**Приборы планшетного типа**[6]		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по четырем каналам – для флуорофоров FAM[7], JOE[7], ROX[7] и Cy5[7].

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

---

[5] Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[6] Например, iCycler iQ5, CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[7] Названия каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

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

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам. В табл. 4 указаны каналы, по которым детектируются выявляемые генотипы *HBV*.

Таблица 4

Детекция по каналу для флуорофора	*Генотип HBV*
FAM	C
JOE	D
ROX	B
Cy5	A

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.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, *отрицательным* в случае отсутствия пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct* или *Cp*) и *сомнительным* во всех других случаях.

Учет результатов в контрольных образцах

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 5.

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

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора			
		FAM	**JOE**	**ROX**	**Cy5**
B–	Экстракция ДНК	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*
K–	ПЦР	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*
$K+_{B/A}$	ПЦР	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
$K+_{C/D}$	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Отсутствует значение *Ct*	Отсутствует значение *Ct*

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов A, B, C и D вируса гепатита B (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *HBV*-генотип-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Учет результатов в исследуемых клинических образцах

1. Если в таблице результатов для пробы определено значение *Ct* только по каналу для флуорофора **FAM**, то выдается результат **«Генотип C *HBV*»**.
2. Если в таблице результатов для пробы определено значение *Ct* только по каналу для флуорофора **JOE**, то выдается результат **«Генотип D *HBV*»**.
3. Если в таблице результатов для пробы определено значение *Ct* только по каналу для флуорофора **ROX**, то выдается результат **«Генотип B *HBV*»**.
4. Если в таблице результатов для пробы определено значение *Ct* только по каналу для флуорофора **Cy5**, то выдается результат **«Генотип A *HBV*»**.
5. Если в таблице результатов для пробы определены два и более значения *Ct*, то выдается двойной, тройной и т. д. генотип.
6. Если в таблице результатов для пробы не определено значение *Ct*, то выдается результат **«Генотип *HBV* не определен»**. При этом, если известно, что концентрация ДНК *HBV* в этой пробе находится в пределах аналитической чувствительности набора реагентов, выдается результат **«Генотип *HBV* не**

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

определен по причине низкой вирусной нагрузки».

ВНИМАНИЕ!

1. Если значение *Ct* хотя бы в одной пробе с положительным контролем этапа ПЦР ($К+_{B/A}$ или $К+_{C/D}$) превышает указанное во вкладыше граничное значение или отсутствует, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех отрицательных образцов, начиная с этапа ПЦР.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по любому из используемых каналов детектируется положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа ПЦР.

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 реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *HBV* генотипы C/D/B/A хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *HBV*-генотип-FL»** направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)[8].

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1» Е.Л.Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

[8] 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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции).
3. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
4. В пробирки с **раствором для лизиса** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести **100 мкл ОКО**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
6. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **12 тыс g** (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение **5 мин**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. 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.
10. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и 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

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

их и переворачивать штатив.

13. Центрифугировать при **12 тыс g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, тщательно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. 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.
17. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

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

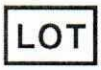
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro диагностики



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Дата изменения



Не допускать попадания солнечного света



Ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель

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