**УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«13» _____ 2026 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса
гепатита А методом ОТ-ПЦР
в режиме реального времени
**РеалБест РНК ВГА (комплект 1)**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест РНК ВГА»** предназначен для выявления РНК вируса гепатита А в сыворотке *(плазме)* крови, в образцах фекалий и пробах воды методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Выделение РНК из клинических проб проводится с помощью наборов: **«РеалБест экстракция 100»**, **«РеалБест экстракция 1000»**.

**Комплект 1** предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналогами.

**Комплект 1** рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК *(полученной методом обратной транскрипции из РНК ВГА)*, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5’-конце флуоресцентный краситель, а на 3’-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5’–3’-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5’-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере

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

накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством кДНК в образце.

Учёт эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК ВГА из проб совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)**.

**2.2. Состав набора:**

- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 фл.;
- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 фл., 4 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1 лист;
- пластиковой крыш-кой для флакона с ПКО – 1 шт.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Специфичность** выявления РНК ВГА определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, СПП ОКС *(рег. № 05-2-214)*, как процентное содержание образцов, определённых набором как отрицательные, и составляет 100%.

3.2. **Чувствительность** определяется по пяти образцам с содержанием 50 копий РНК ВГА в пробе, приготовленным из СОП РНК ВГА *(рег. № 05-2-504)*, как процентное содержание образцов, определённых набором как положительные, и составляет 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность**: клинические исследования, проведённые в двух независимых учреждениях на 48 положительных образцах, показали 100% чувствительность *(интервал 94%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

3.4. **Диагностическая специфичность**: клинические исследования, проведённые в двух независимых учреждениях на 40 отрицательных образцах, показали 100% специфичность *(интервал 93%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.**

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (*Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).*

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности *(опасности)* и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного

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

объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ОТ-ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией *(см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»)*.

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналог;
- ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом *(фирма «Ламинарные системы», Россия);*
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия)*;
- термошейкер, оснащенный термоблоком для пробирок вместимостью 2 мл и позволяющий проводить встряхивание 1300 об/мин и температуре (56–60) °С *(«Thermo Shaker TS-100», фирма «BioSan», Латвия; или аналогичный)*;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» с регулируемой скоростью вращения *(«Bio-Vortex V-1 plus», фирма «BioSan», Латвия; или аналогичный)*;
- медицинский отсасыватель *(В40, фирма «Висма-Планар», Беларусь; или аналогичный)*;
- пипетки полуавтоматические *(дозаторы механические)* одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками *(фирма «Ленпипет», Россия; фирма «Biohit», Финляндия)*;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия)*;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером *(фирма*

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

«*FinnTip*», *Финляндия*);

- магнитный штатив для пробирок на 2 мл *(АО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный)*;
- штативы для пробирок вместимостью 1,5–2 мл и 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»; или аналогичный);*
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл *(фирма «SSI», США, кат. № 2340; или аналогичные).*

## 6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Для анализа используются пробы выделенной РНК, полученные из клинического материала и из образцов окружающей среды с помощью набора: **«РеалБест экстракция 100»**, **«РеалБест экстракция 1000»** согласно инструкции по применению к соответствующему набору.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и **отрицательный контрольный образец (ОКО)**, который является компонентом набора для выделения РНК.

***Внимание!*** *Выделенная РНК хранению не подлежит. Проводить выделение РНК в день постановки ОТ-ПЦР!*

### 6.2. Подготовка ПКО к процедуре выделения РНК.

Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить **1 мл РВК**, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18–25) °С 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

*После восстановления хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или в аликвотах по 50 мкл при минус (18–24) °С до 3 месяцев.*

### 6.3. Подготовка компонентов набора к анализу.

Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке *(не вскрывая!)* при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

***Внимание!*** *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.*

*После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °С составляет 3 месяца.*

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы)* пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

***Внимание!*** *Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка*

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

*должна оставаться чистой!*

7.2. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной РНК**. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции с последующей амплификацией специфических фрагментов **кДНК ВГА**, **кДНК ВКО** и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).*

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.*

7.6. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента **кДНК ВКО** в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором **«FAM»**. Для детекции следует выбирать канал детекции **«FAM»**.

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента **кДНК ВГА** в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором **«ROX»**. Для детекции следует выбирать канал детекции **«ROX»**.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контрольным и образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В **ПКО** программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала специфического продукта амплификации **кДНК ВГА** *(канал «ROX»)* и определяться значение порогового цикла **Ct ВГА**;

– нарастание сигнала амплификации **кДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определяться значение порогового цикла **Ct ВКО**.

8.2. В **ОКО** должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО и определяться **Ct** ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГА.

Если для ОКО значение **Ct ВГА меньше или равно 40**, то это свидетельствует о **наличии контаминации** в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.4.

8.3. В **каждом исследуемом образце** должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента **кДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определяться **Ct ВКО**. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение **Ct** ВКО по каналу **«FAM» меньше или равно 40.**

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

## 9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить (**Ct** ВКО)$_{ср}$ как среднее значение **Ct** ВКО всех анализируемых образцов *(включая ПКО и ОКО)*. Отбраковке подлежат значения **Ct** ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения (**Ct** ВКО)$_{ср}$. После отбраковки пересчитать (**Ct** ВКО)$_{ср}$ для оставшихся значений.

9.2. Анализируемый образец учитывается как **отрицательный** *(не содержащий РНК ВГА)*, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» больше 40 или не определяется.**

Если для такого образца значение **Ct** ВКО превышает значение (**Ct** ВКО)$_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. В случае повторения результата следует провести повторный забор образца крови и снова повторить анализ.

9.3. Анализируемый образец считается **по**ложительным, т.е. содержащим РНК ВГА, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40.**

9.4. Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40**, то это свидетельствует о **наличии контаминации** в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.5. При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» возможно использование программы **«РеалБест Диагностика»**, которая выполняет все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

## 11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической

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

документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

*По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:*

*630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,*
*тел. (383): 252-51-62, 227-60-30;*
*тел./факс (383): 252-51-81, 252-51-77;*
*E-mail: plkobtk@vector-best.ru*

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Проведение анализа на приборе «ДТ-96»

*(НПО «ДНК-Технология»)*

**1. Настройка экспозиции измерений.**

В режиме **«Работа с прибором»** в меню **«Настройки»** выберите пункт **«Экспозиция измерений»**.

В открывшемся окне выберите канал **«FAM»**, измените значение экспозиции на **«250»**, для каналов **«HEX»** и **«ROX»** установите значение экспозиции **«1000»**. Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав **«ДА»**.

***Внимание!*** *Указанные значения экспозиций применимы только для наборов **«РеалБест»** и при необходимости должны быть изменены на исходные.*

**2. Программирование амплификатора:**

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку **«Создать»** во вкладке **«Запуск программы амплификации»**.

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

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов **«РеалБест ДНК»:**

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.*

Для наборов **«РеалБест РНК»:**

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.*

2.3. В ячейке **«Имя программы»** ввести название созданного протокола амплификации *(например, PCR и RT-PCR)* и нажать **«ОК»**. В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать **«сохранить»**.

2.4. В ячейке **«Объём рабочей смеси»** указать значение «**50**».

2.5. Во вкладке **«Протокол»** сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню **«Тест»** выбрать **«Создать/редактировать тест»**, затем **«Копировать текущий тест»** с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте **«1.Анализ»** выставить тип анализа *(количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором)* и метод **«Геометрический (Ср)»**.

Для качественного анализа в пункте **«4.Контроли»** выставить «**1**»; для количественного анализа со стандартами *(при постановке с КО1, КО2)* в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** выставить «**2**», в ячейке **«2.Дубли»** – «**3**», в пункте **«4.Контроли»** в ячейке **«$К^+$»** выставить «**3**», в ячейке **«$К^-$»** – «**1**».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** поставить «**0**».

В пункте **«5.Объём рабочей смеси в пробирке»** выставить значение «**50**».

В пункте **«6. Флуорофоры»** обозначить **внутренний контроль (ВК)** по каналу **«FAM»** и специфику по каналу **«HEX»** или **«ROX»** в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать **«ОК»**.

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку **«Добавить тест»**, из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать **«Применить»**.

2.6. Программа перейдет на вкладку **«Запуск программы амплификации»**, запустить амплификацию кнопкой **«Запуск программы»**. Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «**Запуск программы**» в файл с расширением *.r96.

## 3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «**FAM**» и «**ROX**» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

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

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу **Геометрический (Ср).**

**При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».**

## ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

| | | | |
|---|---|---|---|
| REF | Номер по каталогу | IVD | Медицинское изделие для диагностики *in vitro* |
| Σ n | Содержимого достаточно для проведения n количества тестов | NON STERILE | Не стерильно |
| LOT | Код партии | | Температурный диапазон |
| | Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число | | Изготовитель |
| | Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число | | Обратитесь к Инструкции по применению |
| | Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению | | |

*Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-71.*

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