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 одновременного выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*), ДНК вируса гепатита В (*HBV*) и РНК вируса иммунодефицита человека (*HIV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-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 ... 4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ... 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ ... 6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ ... 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ... 9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ... 13
ФОРМАТ FRT ... 15
СОСТАВ ... 15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ... 18
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ... 19
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ... 19
А1. Подготовка пробирок для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT ... 20
А2. Подготовка пробирок для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-A ... 22
А3. Подготовка пробирок для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-4x ... 22
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ... 24
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ... 26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ... 29
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ ... 30
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 ... 31
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 ... 32
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 ... 34
А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы ... 34
Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы ... 36
ПРИЛОЖЕНИЕ 4 ... 39
Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» ... 39
Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» ... 41
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ ... 44

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
К–	– отрицательный контроль ПЦР
К+	– положительный контроль ПЦР
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОТ	– обратная транскрипция
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
HCV	– вирус гепатита С
HBV	– вирус гепатита В
HIV-1	– вируса иммунодефицита человека типа 1
HIV-2	– вируса иммунодефицита человека типа 2
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-FL»** предназначен для одновременного выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*), ДНК вируса гепатита В (*HBV*) и РНК вируса иммунодефицита человека (*HIV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Набор реагентов может быть использован для анализа как индивидуальных образцов, так и нескольких образцов плазмы, объединенных в мини-пул. Для индивидуального тестирования возможно проведение экстракции нуклеиновых кислот из 100, 200 или 1000 мкл плазмы крови. При проведении исследования мини-пулов рекомендуемый объем для проведения экстракции нуклеиновых кислот составляет 1000 мкл. Объем каждого индивидуального образца плазмы крови, входящего в состав мини-пула, не должен быть менее 100 мкл. Рекомендуемое количество образцов плазмы крови, входящих в состав мини-пула – от 4 до 10 с общим объемом 1000 мкл.

Примеры методов экстракции РНК/ДНК, используемые объёмы экстракции и возможность тестирования образцов,

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

объединенных в мини-пул, представлены в таблице.

Метод экстракции	Допустимые объёмы плазмы крови, используемые для экстракции РНК/ДНК, мкл	Возможность тестирования образцов плазмы крови, объединенных в мини-пул
«МАГНО-сорб»	200	нет
	1000	до 10 образцов
NucliSENS easyMAG	100	нет
	1000	до 10 образцов
QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit	1000	до 10 образцов
«РИБО-сорб»	100	нет
«РИБО-преп»	100	нет

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК вируса гепатита С (*HCV*), ДНК вируса гепатита В (*HBV*) и РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (*HIV*-1) и типа 2 (*HIV*-2) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: 1) экстракцию РНК/ДНК из плазмы крови совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО) с помощью автоматических станций QIAsymphony SP и NucliSENS easyMAG, либо ручным методом с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» или «РИБО-преп»; 2) проведение обратной транскрипции РНК и амплификации ДНК/кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По каналу FAM/Green детектируется продукт амплификации кДНК *HCV*. По каналу JOE/HEX/Yellow детектируется продукт амплификации кДНК *HIV*-1. По каналу ROX/Orange детектируется продукт амплификации ДНК *HBV*. По каналу Cy5/Red детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца). По каналу Cy5.5/Crimson детектируется продукт амплификации кДНК *HIV*-2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x предназначен для амплификаторов с четырьмя каналами флуоресцентной детекции, при его использовании продукт амплификации кДНК

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

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

HIV-2 не детектируется. Положительный контрольный образец этапа экстракции – ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec – является комплексным для всех четырёх инфекций и детектируется по каналам FAM/Green (*HCV*), JOE/HEX/Yellow (*HIV*-1), ROX/Orange (*HBV*), Cy5/Red (ВКО) и Cy5.5/Crimson (*HIV*-2). Положительный контрольный образец амплификации – ПКО кДНК *HCV* / *HBV* / *HIV* – также является комплексным для *HCV*, *HBV*, *HIV*1, *HIV*2 и ВКО и аналогично детектируется по соответствующим каналам.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот QIAsymphony SP (Qiagen, Германия) и «ПЦР-комплект» вариант FRT-A, адаптированный для автоматического модуля приготовления реакционных смесей QIAsymphony AS (Qiagen, Германия).

Форма 3 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 и «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-A, адаптированный для автоматического модуля приготовления реакционных смесей QIAsymphony AS (Qiagen, Германия).

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x.

Формы комплектации 1 и 3 предназначены для полного анализа, включающего экстракцию РНК/ДНК из клинического материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК/ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 4, 5 и 6 предназначены для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК/ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-

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

исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Объём образца для экстракции, мкл	Метод экстракции	Аналитическая чувствительность			
		***HCV*, МЕ/мл**	***HBV*, МЕ/мл**	***HIV*-1, копий/мл**	***HIV*-2*, копий/мл**
100	«РИБО-сорб» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	100	50	200	600
200	«МАГНО-сорб»	50	25	100	300
1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit	10	5	20	60

***ВНИМАНИЕ! При использовании формы комплектации 6 (комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x) РНК *HIV*-2 не детектируется.**

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А; 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*, *S.agalactiae*; *Homo sapiens*.

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV

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

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 выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранить в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[2], биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

[2] 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

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо их открывание 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[3]. 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.
- 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

[3] 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

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 и обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS –safety data sheet) доступны по запросу.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно 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 набор безопасен.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция ДНК/РНК из клинического материала

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, BioSan, Латвия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема с возможностью дозирования от 1 до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
4. Штативы для пробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Axygen, США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, США).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК/ДНК.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

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

8. Емкость для сброса наконечников.

При использовании автоматической станции QIAsymphony SP:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК QIAsymphony SP (Qiagen, Германия).
2. Набор реактивов QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit (Qiagen, Германия).
3. Расходные материалы к автоматической станции QIAsymphony SP производства Qiagen, Германия:
   - Одноразовые наконечники для магнитных стержней (144 шт/уп)
   - Вспомогательные ванночки (10 шт/уп)
   - Ящик для отработанных наконечников (15 шт/упак)
   - Держатель картриджа для реагентов
   - 8 –луночный картридж для пробоподготовки (336 шт/упак)
   - Наконечники с фильтром объемом 1500 мкл (32 наконечника/штатив)
   - Наконечники с фильтром объемом 200 мкл (32 наконечника/штатив)
4. Полистиреновые круглодонные пробирки 17 х 100 мм, объемом 14 мл производства Becton, Dickinson and Company (США, каталожный номер 352051).

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (ТУ 9398-106-01897593-2012):

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия).
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл (например, Promega, США).
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм (например, Promega, США).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).

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

7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные (например, Axygen, США).
8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм (например, Axygen, США).
9. Электронный или механический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
10. Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема до 5000 мкл (например, Axygen, США).
11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема фильтра до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, США).

При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК NucliSENS easyMAG (поставщик «ИнтерЛабСервис», Россия).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции NucliSENS easyMAG (буфер для экстракции 1, буфер для экстракции 2, буфер для экстракции 3, буфер для лизиса, магнитная силика, комплект расходных материалов) (bioMérieux, Франция).

При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) или «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008):

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия).
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axygen, США).

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и

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

гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. **Для форм комплектации 1, 3, 4, 5** необходим амплификатор роторного типа, например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), либо амплификаторы, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов, с **возможностью одновременной детекции флуоресценции по пяти независимым каналам**, соответствующим флуоресцентным красителем FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5.
   Для формы комплектации 6 необходим амплификатор роторного типа, например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия, либо амплификаторы, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов, с возможностью одновременной детекции флуоресценции по четырем или более независимым каналам, соответствующим флуоресцентным красителем FAM, JOE, ROX, Cy5.
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, BioSan, Латвия).
4. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Для приборов для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene). Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, Axygen, США) для постановки в ротор на 36 пробирок либо одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл (Corbett Research, Австралия) для постановки в ротор на 72 пробирки.
   Для приборов для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, «ДТ-96»). Одноразовые полипропиленовые пробирки или стрипы для ПЦР объемом

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

0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Axygen, США).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и 200 мкл (например, Axygen, США).
7. Штативы для наконечников (например, Axygen, США) и пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК/ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

При приготовлении реакционной смеси с использованием автоматического модуля QIAsymphony AS:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК и приготовления реакционных смесей QIAsymphony SP + AS (Qiagen, Германия).
2. Расходные материалы к автоматическому модулю QIAsymphony AS (Qiagen, Германия):
   - Наконечники с фильтром объемом 1500 мкл
   - Наконечники с фильтром объемом 200 мкл.
   - Наконечники с фильтром объемом 50 мкл.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g. Хранить плазму можно не более 5 сут 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

В отдельных случаях допускается использование сыворотки крови. Аналитическая чувствительность набора реагентов для данного материала сохраняется, однако клиническая чувствительность ввиду осаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 5 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

Набор реагентов «АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-FL» может быть использован для анализа как индивидуальных образцов, так и нескольких образцов плазмы, объединенных в мини-пул. Рекомендуемое количество образцов плазмы крови, входящих в состав мини-пула – от 4 до 10 с общим объемом экстракции нуклеиновых кислот 1000 мкл.

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот QIAsymphony SP – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Картридж с реагентами	–	–	2 штуки
Прокалывающая крышка	–	–	2 штуки
Штатив с ферментами	–	–	2 штуки
Буфер AVE	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Буфер AVE	Прозрачная бесцветная жидкость	2	2 флакона
Носитель РНК	Порошок белого цвета	1350 мкг	2 пробирки
Упаковка уплотнительных полосок	–	–	2 штуки

Комплект QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот QIAsymphony SP рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 96 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная жидкость[4] от бесцветного до желтого или розового цвета	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная жидкость[2] от бесцветного до желтого или розового цвета	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона

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

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

Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб объемом 1000 мкл, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита С (*HCV*), кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (*HIV*-1) и типа 2 (*HIV*-2) и ДНК вируса гепатита В (*HBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **– включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* / *HBV* / *HIV*1 / *HIV*2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО кДНК *HCV* / *HBV* / *HIV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 5.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки
ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-A – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита С (*HCV*), кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (*HIV*-1) и типа 2 (*HIV*-2), ДНК вируса гепатита В (*HBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», адаптированный для автоматического модуля приготовления реакционных смесей QIAsymphony AS – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,055	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* / *HBV* / *HIV*1 / *HIV*2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,35	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,35	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,055	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
ПКО кДНК *HCV* / *HBV* / *HIV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 4.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита С (*HCV*), кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (*HIV*-1), ДНК вируса гепатита В (*HBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV / HBV / HIV*	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,3	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО кДНК *HCV / HBV / HIV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.
К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки
ПКО *HCV / HBV / HIV*-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК/ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот QIAsymphony SP порядок работы см. в приложении **1** «Экстракция РНК/ДНК с использованием автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот QIAsymphony SP».
- при использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG порядок работы см. в приложении **2** («Экстракция РНК/ДНК с использованием автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG»).
- при использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» порядок работы для экстракции РНК/ДНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в приложении **3** («Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»).

При использовании комплектов реагентов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов, порядок работы см. в приложении **4** («Экстракция РНК/ДНК с использованием комплектов, не входящих в состав данного набора реагентов»).

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

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакции – 50 мкл, включая объем пробы РНК/ДНК – 30 мкл.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК/ДНК необходимо использовать

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

только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

А1. Подготовка пробирок для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

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

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов (два контроля этапа экстракции и два контрольных образца этапа ПЦР). Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси** смешать реагенты на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, в соответствии с **расчетной таблицей** (см. табл. 1).
4. При проведении тестирования 22 клинических образцов (24 образца после этапа экстракции) рекомендуется следующий способ смешивания: в пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT *HCV* / *HBV* / *HIV*1 / *HIV*2 (0,3 мл)** добавить все содержимое пробирки с **ОТ-ПЦР-смесью-2-FL (0,3 мл)**, все содержимое пробирки с **полимеразой (TaqF) (0,03 мл)**, все содержимое пробирки с **ТМ-Ревертазой (MMlv) (0,015 мл)** и **0,015 мл RT-G-mix-2**. Тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
5. Внести в пробирки по **20 мкл готовой реакционной смеси.** Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.
6. Используя наконечник с фильтром, добавить по **30 мкл**

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

каждой пробы РНК/ДНК в пробирку с реакционной смесью. Пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

7. Поставить **контрольные реакции**:
   а) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести **30 мкл ПКО кДНК *HCV* / *HBV* / *HIV*;**
   б) отрицательный контроль ПЦР (К–) – в пробирку с реакционной смесью внести **30 мкл буфера для элюции.**

ВНИМАНИЕ! Пробирки с добавленными контрольными образцами необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей

		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом				
Объем реагента на одну реакцию, мкл		**10,00**	**10,00**	**1,00**	**0,50**	**0,50**
Число клинических образцов	**Число исследуемых точек в ПЦР[5]**	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV* / *HBV* / *HIV*1 / *HIV*2**	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FL**	**Полимераза (TaqF)**	**RT-G-mix-2**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
6	**10**	**110**	**110**	**11**	**5**	**5**
8	**12**	**130**	**130**	**13**	**6**	**6**
10	**14**	**150**	**150**	**15**	**7**	**7**
12	**16**	**170**	**170**	**17**	**8**	**8**
14	**18**	**190**	**190**	**19**	**9**	**9**
16	**20**	**210**	**210**	**21**	**10**	**10**
18	**22**	**230**	**230**	**23**	**11**	**11**
20	**24**	**250**	**250**	**25**	**12**	**12**
22[6]	**26**	**Все содержимое пробирки**	**Все содержимое пробирки**	**Все содержимое пробирки**	**15**	**Все содержимое пробирки**

[5] Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 2 контроля ОТ-ПЦР, (N+4, N – количество клинических образцов).

[6] Стандартная экстракция из 24 образцов на приборе NucliSENS easyMAG или с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

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

А2. Подготовка пробирок для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-А

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-А адаптирован для автоматического модуля приготовления реакционных смесей QIAsymphony AS. Приготовление реакционных смесей, внесение проб РНК/ДНК и контролей в пробирки с реакционной смесью происходит автоматически. Для набора реагентов «АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-FL» необходимо использовать протокол AmpliSens_RG, предустановленный в приборе. Работу с автоматическим модулем QIASymphony AS проводить в строгом соответствии с инструкцией к прибору.

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

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционных смесей для проведения ПЦР с помощью автоматического модуля допускается не использовать контрольные образцы реакции амплификации (К+ и К–).

А3. Подготовка пробирок для амплификации при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-4х

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

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

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек

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

пробирок.

2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (два контроля этапа экстракции и два контрольных образца этапа ПЦР). Тип пробирок стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси** смешать реагенты на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов в соответствии с **расчетной таблицей** (см. табл. 2).
4. При проведении тестирования 22 клинических образцов (24 образца после этапа экстракции) рекомендуется следующий способ смешивания: в пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT *HCV / HBV / HIV* (0,3 мл)** добавить **все содержимое пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-2-FL (0,3 мл)**, **все содержимое пробирки с полимеразой (TaqF) (0,03 мл)**, **все содержимое пробирки с ТМ-Ревертазой (MMlv) (0,015 мл) и 0,015 мл RT-G-mix-2.** Тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
5. Внести в пробирки по **20 мкл готовой реакционной смеси.** Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.
6. Используя наконечник с фильтром, добавить по **30 мкл каждой пробы РНК/ДНК в пробирку с реакционной смесью. Пробирки необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.**
7. Поставить **контрольные реакции**:
   а) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести **30 мкл ПКО кДНК *HCV / HBV / HIV*;**
   б) отрицательный контроль ПЦР (К–) – в пробирку с реакционной смесью внести **30 мкл буфера для элюции;**

ВНИМАНИЕ! Пробирки с добавленными контрольными образцами необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа

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

рекомендуется осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 2

Схема приготовления реакционных смесей

		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом				
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		**10,00**	**10,00**	**1,00**	**0,50**	**0,50**
Число клинических образцов	**Число исследуемых точек в ПЦР[7]**	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV / HBV / HIV***	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FL**	**Полимераза (TaqF)**	**RT-G-mix-2**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
6	**10**	**110**	**110**	**11**	**5**	**5**
8	**12**	**130**	**130**	**13**	**6**	**6**
10	**14**	**150**	**150**	**15**	**7**	**7**
12	**16**	**170**	**170**	**17**	**8**	**8**
14	**18**	**190**	**190**	**19**	**9**	**9**
16	**20**	**210**	**210**	**21**	**10**	**10**
18	**22**	**230**	**230**	**23**	**11**	**11**
20	**24**	**250**	**250**	**25**	**12**	**12**
22[8]	**26**	**Все содержимое пробирки**	**Все содержимое пробирки**	**Все содержимое пробирки**	**15**	**Все содержимое пробирки**

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

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 3, 4).

[7] Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 2 контроля ОТ-ПЦР, (N+4, N - количество клинических образцов).

[8] Стандартная экстракция из 24 образцов на приборе NucliSENS easyMAG или с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

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

Таблица 3

Программа амплификации «АмплиСенс *HBV* / *HCV* / *HIV*» для приборов роторного типа[9]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
1	50	20 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	4
	46	40 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	40 с	–	
	45	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5,5/Crimson	

ВНИМАНИЕ! При использовании формы комплектации 6 (комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x) канал Cy5,5/Crimson не используется.

Таблица 4

Программа амплификации «АмплиСенс *HBV* / *HCV* / *HIV*» для приборов планшетного типа[10]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
1	50	20 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	4
	46	40 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	40 с	–	
	40	40 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red Cy5,5/Crimson	

ВНИМАНИЕ! При использовании формы комплектации 6 (комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x) канал Cy5,5/Crimson не используется.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу

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

[10] 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

и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени»:

– по каналу для флуорофора FAM/Green регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *HCV*;
– по каналу JOE/HEX/Yellow регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *HIV*-1;
– по каналу ROX/Orange регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *HBV*;
– по каналу Cy5/Red регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО;
– по каналу Cy5.5/Crimson регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *HIV-2*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуореценции, и значение порогового цикла (*Ct* или *Cp*) для данного канала менее указанного во вкладыше к набору реагентов; *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct* или *Cp*); *сомнительным* во всех

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

других случаях.

См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального времени» и методические рекомендации по применению набора реагентов для одновременного выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*), РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (*HIV*-1) и типа 2 (*HIV*-2) и ДНК вируса гепатита В (*HBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *HCV* / *HBV* / *HIV*-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Образец считается положительным по содержанию ДНК *HBV,* РНК *HCV,* РНК *HIV*-1 и РНК *HIV*-2, если на соответствующем канале получено значение *Ct,* не превышающее граничное значение, указанное во вкладыше, при этом значение *Ct* на канале Cy5 менее указанного граничного значения.

Образец считается отрицательным по содержанию ДНК *HBV,* РНК *HCV,* РНК *HIV*-1 и РНК *HIV*-2, если на соответствующем канале отсутствует значение *Ct* или получено значение *Ct* более указанного граничного значения, при этом значение *Ct* на канале Cy5 менее указанного граничного значения.

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

ВНИМАНИЕ! При использовании формы комплектации 6 (комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-4x) канал Cy5,5/Crimson не используется и анализ результатов по данному каналу не проводится.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 5).

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

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Значение Ct по каналу				
	FAM	**JOE/HEX**	**ROX**	**Cy5**	**Cy5,5**
ОК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	отсутствует
ПК	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)
К–	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)	*Ct* ≤ значения, указанного во вкладыше (положительный)

Граничные (максимально допустимые) значения пороговых циклов (*Ct*) для контрольных образцов указаны во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ!

1. Если значение *Ct* на каналах FAM, JOE, ROX или Cy5.5 более указанного граничного значения, а значение *Ct* на канале Cy5 также более указанного граничного значения, то требуется перестановка данной пробы, начиная с этапа экстракции.
2. Если для положительного контроля этапа экстракции (ПК) или положительного контроля этапа ПЦР (К+) по любому из 5 флуоресцентных каналов значение *Ct* отсутствует или более указанного граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Если для отрицательного контроля экстракции (ОК) (по каналам FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5.5) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) (по всем флуоресцентным каналам) зафиксировано значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

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 QIAsymphony Virus/Bacteria Midi Kit для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот QIAsymphony SP хранить в соответствии с инструкцией производителя. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-A и вариант FRT-4x, включая контрольные образцы этапа экстракции, хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV / HBV / HIV*1 / *HIV*2 и ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *HCV / HBV / HIV* хранить в защищенном от света месте.

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

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, д. 3А, e-mail: cs@pcr.ru[11].

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

[11] 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 РНК/ДНК с использованием автоматической станций QIAsymphony SP

Порядок работы

1. Заполнить штатив QIASymphony пробирками с исследуемыми образцами и контролями (положительным и отрицательным), затем штатив установить в позицию 1 загрузочного шлюза станции. При наличии штрих-кода на пробирке происходит его автоматическое считывание во время загрузки штатива. При отсутствии штрих-кода на пробирке необходимо вручную присвоить данному образцу виртуальный штрих-код.
2. Пробирку с внутренним контролем установить в другой штатив QIASymphony, затем штатив установить в позицию «А» загрузочного шлюза станции.
3. Закрыть дверцу загрузочного шлюза.
4. Установить картридж с реагентами и расходные материалы (производства Qiagen, Германия) в строгом соответствии с инструкцией производителя.
5. Запустить протокол экстракции в соответствии с инструкцией к прибору QIASymphony SP.

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция РНК/ДНК с использованием автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG

Порядок работы.

А. Экстракция РНК/ДНК автоматическим лизисом образца в приборе

1. Поставить флакон с буфером для лизиса NucliSens в прибор.
2. Для повышения чувствительности метода, особенно в случаях исследования мини-пулов, рекомендуется исследовать 1 мл. В каждую ячейку картриджа, предназначенного для экстракции РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить от 100 мкл до 1 мл исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром.
3. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК, добавить **100 мкл ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec**.
4. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК, добавить **100 мкл ОКО**.
5. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
6. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (***Matrix***) для экстракции РНК – плазма (***Plasma***); объем образца (***Volume***) – от **100 mkl до 1 ml**, в зависимости от объема используемого клинического материала; объем элюции (***Eluate***) – 55 mkl; тип образца (***Tipe***) – ***Primary***; очередность экстракции РНК в образцах (***Priority***) – ***Normal***.
7. Создать новый протокол экстракции РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: ***On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes***, ***On-board Lysis Incubation – Yes***.
8. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.

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

9. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, **запустить программу** экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (***On board***).
10. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать **магнитную силику NucliSens** и **ВКО STI-87-rec** стерильными наконечниками с фильтрами в следующем соотношении:

Количество образцов для экстракции РНК/ДНК	**Количество магнитной силики NucliSens, мкл**	**Количество ВКО STI-87-rec, мкл**
1	20	10
8	180	90
16	340	170
24 (полная загрузка прибора)	500 (с запасом на одну пробирку)	250

11. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG остановит работу в положении ***Instrument State – Idle*** (приблизительно через 15 мин).
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по 30 мкл смеси магнитной силики NucliSens и ВКО STI-87-rec. Тщательно перемешать пипетированием, используя дозатор и наконечник объемом до 1 мл.
13. Продолжить программу экстракции РНК/ДНК на приборе. После окончания экстракции РНК/ДНК извлечь картридж с образцами из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК/ДНК провести реакцию ОТ-ПЦР. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы
Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции ДНК/РНК из 24 образцов:
   а) во флакон с **лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл)** внести **0,28 мл ВКО STI-87-rec,** все содержимое пробирки с **компонентом А (0,6 мл)** и все содержимое пробирки **с магнетизированной силикой (0,9 мл).**
   б) закрыть крышку флакона и **аккуратно** перемешать переворачиванием 5-7 раз, избегая образования пены.
   в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** подготовленной смеси **лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО STI-87-rec, компонента А и магнетизированной силики.**
4. При экстракции ДНК/РНК менее чем из 24 образцов:
   а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО STI-87-rec**, **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-87-rec, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас и рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК/ДНК	ВКО STI-87-rec, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

   б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО STI-87-rec, компонента А и магнетизированной силики.
   в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.

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

5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл исследуемого образца плазмы** и перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК с лизирующим раствором добавить **100 мкл ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec**, перемешать пробирку на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой и осадить капли жидкости с крышки.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**.
10. Используя наконечники без фильтра на 1000 мкл, осторожно, по внутренней стенке пробирки, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
13. Ресуспендировать магнетизированную силику со стенок осторожным вортексированием, а затем пипетированием и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать **2 мин**.
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Добавить **700 мкл раствора для отмывки 5**, ресуспендировать магнетизированную силику и повторить пп. 14-15.

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

17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем коротко осадить капли на вортексе.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
21. Добавить **70 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК/РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы

Порядок работы

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО STI-87-rec**, **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-87-rec, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики.

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

При расчете необходимо учитывать запас и рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК/ДНК	ВКО STI-87-rec, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО STI-87-rec, компонента А и магнетизированной силики.
5. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **200 мкл исследуемого образца плазмы** и перемешать на вортексе.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК с лизирующим раствором добавить **100 мкл ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec,** перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
10. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
11. Осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.
13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.

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

15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
21. Добавить **70 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК/РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Экстракция РНК/ДНК с использованием комплектов реагентов, не входящих в состав данного набора реагентов

Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с **формой 4** гарантируются только в случае экстракции РНК/ДНК при помощи комплектов реагентов, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО STI-87-rec.**
4. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

   Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **раствора для лизиса и ВКО STI-87-rec** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО STI-87-rec) с последующим разнесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.
5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК с раствором для лизиса добавить **100 мкл ПКО *HCV* / *HBV* /**

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

***HIV*-rec,** перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **12 тыс g** (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) **в течение 5 мин**.
11. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **13 тыс g в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
16. Центрифугировать при **13 тыс g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
17. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать

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

на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

20. Центрифугировать пробирки при **13 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес и не выше минус 68 °С в течение года.

Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»

Порядок работы.

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

   Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **лизирующего раствора и ВКО STI-87-rec** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО STI-87-rec) с последующим разнесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.
5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК с лизирующим раствором добавить **100 мкл ПКО *HCV* / *HBV* / *HIV*-rec,** перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

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

7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с температурой 60 °С на 10 мин. Осадить на центрифуге для сброса капель конденсата с крышки.
9. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.
10. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g (например, 10000 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
12. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать раствор для отмывки 3 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 4**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Полностью отобрать раствор для отмывки 4 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

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

16. Высушить сорбент, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °С на 10 мин.
17. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл РНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °С 5 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года. При появлении признаков взмучивания сорбента необходимо вновь осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g в течение 1 мин.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Медицинское изделие для *in vitro* диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

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