

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 10.04.2012 № 1701-Пр/12

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



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HCV-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	12
ФОРМАТ FEP	14
СОСТАВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	18
А. Подготовка пробирок для амплификации	18
Б. Проведение амплификации	21
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	23
ФОРМАТ FRT	25
СОСТАВ.....	25
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	27
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	29
А. Подготовка пробирок для амплификации	29
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	31
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	33
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп».....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- сорб».....	41
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- сорб».....	44
А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы.....	44
Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы.....	46
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	49

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 2 из 49

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
FEP	– флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HBV	– вирус гепатита В
HCV	– вирус гепатита С
HDV	– вирус гепатита D («Дельта»)
HGV	– вирус гепатита G

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® HCV-FL» предназначен для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из плазмы крови.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови совместно с ВКО, проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» (формат FEP) или в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ВКО. По каналу, соответствующему флуорофору

¹ В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

JOE, детектируется продукт амплификации кДНК *HCV*. Положительный контрольный образец этапа экстракции ПКО-1-*HCV* детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (*HCV*). Контрольный образец амплификации – KB2 *HCV* – является комплексным для *HCV* и ВКО и аналогично детектируется по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (*HCV*).

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах:

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FEP.

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

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала магнитной сепарацией и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV1-S-FEP; [REF](#) HK2-0192-2; Форма 4: [REF](#) V1-FEP; [REF](#) H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0192-1;

Форма 4: [REF](#) R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0194-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 4 из 49

Форма комплектации 4 предназначена для проведения амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 – 2 штуки, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

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

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

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

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала магнитной сепарацией и

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV1-S-FEP; [REF](#) HK2-0192-2; Форма 4: [REF](#) V1-FEP; [REF](#) H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0192-1;

Форма 4: [REF](#) R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0194-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 5 из 49

амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Формат	Объём экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность, МЕ/мл
Формат FEP	100	РИБО-сорб» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	250
	200	«МАГНО-сорб»	125
	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	25
Формат FRT	100	«РИБО-сорб» «РИБО-преп» NucliSENS easyMAG	100
	200	«МАГНО-сорб»	50
	1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	10

Аналитическая специфичность

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

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV1-S-FEP; [REF](#) HK2-0192-2; Форма 4: [REF](#) V1-FEP; [REF](#) H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0192-1;

Форма 4: [REF](#) R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0194-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 7 из 49

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой

- и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала

1. Ламинарный бокс.
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл.
6. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

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.
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
4. Одноразовые наконечники до 200 мкл.
5. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

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.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 10 из 49

8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм.
9. Автоматический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл.
10. Одноразовые наконечники до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)).
3. Для автоматической станции, например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) требуется дополнительный комплект реагентов «ЕМ-плюс» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

9. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV1-S-FEP; [REF](#) HK2-0192-2; Форма 4: [REF](#) V1-FEP; [REF](#) H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0192-1;

Форма 4: [REF](#) R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0194-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 11 из 49

Biosystems, США), MaxyGene (Axygen, США) или аналогичные).

10. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (Bio-San, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), «Джин» (версия п.о. не ниже 4.4i) («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

11. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия)) или амплификатор планшетного типа (например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США)) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

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 г. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV1-S-FEP; [REF](#) HK2-0192-2; Форма 4: [REF](#) V1-FEP; [REF](#) H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0192-1;

Форма 4: [REF](#) R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0194-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 12 из 49

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 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

**ФОРМАТ FEP
СОСТАВ**

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

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 1 в количестве 2 шт.

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ²	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ²	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 2 в количестве 2 шт.

² При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 14 из 49

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ³	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ³	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
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, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита С (HCV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
RT-G-mix-3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
KB2 HCV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

³ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 15 из 49

Комплект реагентов рассчитан на проведение 112 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 4.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1-НСV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение обратной транскрипции и амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК 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 **«РИБО-преп»** порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-сорб»** порядок работы см. в приложении 2 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»».
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы для экстракции РНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в приложении 3 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»».

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот компаний bioMérieux и Qiagen совместно с набором реагентов необходимо пользоваться протоколами и реагентами, позволяющих проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура экстракции проводится в соответствии с инструкцией к автоматическим станциям, а также с учетом следующих условий:

- а) Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующий раствор до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну пробу.
- б) При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
- в) Программируемый объем элюции – 50-60 мкл (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).
- г) При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) обязательно пользоваться дополнительным комплектом реагентов «ЕМ-плюс» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Допускается использование режимов лизиса в приборе (**On-board**) и вне прибора (**Off-board**).
- д) После окончания экстракции РНК извлечь пробирки из прибора и провести реакцию ОТ-ПЦР. Очищенная РНК 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.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс[®] HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс[®] HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс[®] HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс[®] HBV-FL».

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 1).

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 на 0,2 мл или на 0,5 мл с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (два контроля экстракции, один контроль амплификации) и пробирок «Фон». Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и 0,25 мкл RT-G-mix-3 (см. также табл. 1, пункт А).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

4. Добавить в две пробирки «Фон» по **15 мкл приготовленной смеси** (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы (MMIv)) и по **10 мкл буфера для элюции**, перемешать пипетированием. Сверху добавить по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа пробирок для ПЦР.

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить из расчета на 1 пробу **0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,25 мкл ТМ-Реввертазы (MMIv)** (см. также табл. 1, пункт А). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы (MMIv), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

6. **В случае повторного использования образцов «Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, 0,25 мкл RT-G-mix-3, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,25 мкл ТМ-Реввертазы (MMIv)** (см. также табл. 1, пункт Б). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

7. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси. Сверху добавить по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.

8. В готовые пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из клинических образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» и NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

9. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы РНК, выделенной из образца ПКО-1-*HCV*.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы РНК, выделенной из образца ОКО.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл KB2 HCV**.

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

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей для формата FEP

А. Если пробирки «Фон» готовятся

		Этап 1. Смесью из трех компонентов. Объем реактивов на указанное кол-во образцов с учетом контрольных точек и 2 образцов «Фон» (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)), учтен запас на один образец (мкл)			Этап 2. Внесение ферментов. Кол-во добавляемых ферментов на указанное кол-во образцов после отбора смеси на 2 образца «Фон» (мкл)	
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ⁴	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL <i>HCV</i>	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-3	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
6	9	120	60	3,0	5,0	2,5
10 ⁵	13	160	80	4,0	7,0	3,5
22 ⁶	25	280	140	7,0	13,0	6,5
34	37	400	200	10,0	19,0	9,5
46	49	520	260	13,0	25,0	12,5

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv) рассчитано за вычетом двух пробирок «Фон».

⁴ Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов).

⁵ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 20 из 49

Б. Если используются ранее приготовленные пробирки «Фон»⁷

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0.50	0.25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-3	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMiv)
6	9	100	50	2,5	5,0	2,5
10	13	140	70	3,5	7,0	3,5
22	25	260	130	6,5	13,0	6,5
34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл. 2). Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы

Таблица 2

Программа амплификации

Для амплификаторов с активным регулированием ⁸				Для амплификаторов с матричным регулированием ⁹			
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	2	95	15 мин	1
3	95	2 с	45	3	95	10 с	45
	60	10 с			60	15 с	
					72	15 с	
4	10	Хранение		4	10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к соответствующему прибору)

⁷ Допускается повторное исследование пробирок «Фон» при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа пробирок для ПЦР.

⁸ Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research), MaxyGene (Ахуген), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

⁹ Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra).

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 21 из 49

путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК HCV.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс[®] HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс[®] HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс[®] HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс[®] HBV-FL».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб РНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- значения менее установленного порогового значения отрицательного результата принимаются отрицательными, более установленного порогового значения положительного результата – положительными, между порогами – сомнительными.
- положительный результат по каналу HEX/Yellow свидетельствует о наличии в пробе РНК *HCV*.
- результат исследования невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения отрицательного результата, и сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения.
- при получении сомнительного результата детекции требуется повторное проведение ПЦР-исследования данной пробы.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат автоматической интерпретации
OK	Экстракция РНК, ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – отрицательный
ПК	Экстракция РНК, ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – положительный
К+	ПЦР	FAM/Green – положительный HEX/Yellow – положительный
К–	ПЦР	FAM/Green – отрицательный HEX/Yellow – отрицательный

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа экстракции (ПК) или положительного контроля этапа ПЦР (К+) по каналу HEX/Yellow получен сигнал ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу HEX/Yellow выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

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

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 1 в количестве 2 шт.

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ¹⁰	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ¹⁰	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 2 в количестве 2 шт.

¹⁰ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 25 из 49

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ¹¹	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ¹¹	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
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, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. 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) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	4 пробирки
KB2 HCV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

¹¹ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 26 из 49

Комплект реагентов рассчитан на проведение 112 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 4.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО-1-НСV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	4 пробирки
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	4 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК 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 **«РИБО-преп»** порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-сорб»** порядок работы см. в приложении 2 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб»».
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы для экстракции РНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в приложении 3 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»».

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 27 из 49

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот компаний bioMérieux и Qiagen совместно с набором реагентов необходимо использование протоколов и реагентов, позволяющих проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура экстракции проводится в соответствии с инструкцией к автоматическим станциям, а также с учетом следующих условий:

- а) Обязательным условием является внесение ВКО в образцы или лизирующего раствора до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну пробу.
- б) При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).
- в) Программируемый объем элюции – 50-60 мкл (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).
- г) При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) обязательно пользоваться дополнительным комплектом реагентов «ЕМ-плюс» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Допускается использование режимов лизиса в приборе (**On-board**) и вне прибора (**Off-board**).
- д) После окончания экстракции РНК извлечь пробирки из прибора и провести реакцию ОТ-ПЦР. Очищенная РНК 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.

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) «АмплиСенс[®] HCV-FL», РНК вируса гепатита D (HDV) «АмплиСенс[®] HDV-FL», РНК вируса гепатита G (HGV) «АмплиСенс[®] HGV-FL», ДНК вируса гепатита В (HBV) «АмплиСенс[®] HBV-FL».

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

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 4).

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, контрольных образцов (два контроля экстракции, один контроль амплификации). Тип пробирок стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. **Для приготовления реакционной смеси** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV, 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, 0,25 мкл RT-G-mix-2 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 29 из 49

5. В готовые пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из клинических образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», «МАГНО-сорб» и NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить **контрольные реакции:**

- а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ПК0-1-*HCV*.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ОК0.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл KB2 HCV**.

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

Схема приготовления реакционных смесей для формата FRT

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом на один образец				
		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ¹²	ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
4	7	80	40	2,0	4,0	2,0
6 ¹³	9	100	50	2,5	5,0	2,5
8	11	120	60	3,0	6,0	3,0
10 ¹⁴	13	140	70	3,5	7,0	3,5
12	15	160	80	4,0	8,0	4,0
14 ¹⁵	17	180	90	4,5	9,0	4,5
16	19	200	100	5,0	10,0	5,0
18	21	220	110	5,5	11,0	5,5
20	23	240	120	6,0	12,0	6,0
22 ¹⁶	25	260	130	6,5	13,0	6,5
34	37	380	190	9,5	19,0	9,5
46	49	500	250	12,5	25,0	12,5

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
2. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6).

¹² Число клинических образцов + 2 контроля этапа экстракции РНК + 1 контроль ОТ-ПЦР, (N+3, N - количество клинических образцов).

¹³ Экстракция одного стрипа на приборе NucliSENS easyMAG (8 пробирок).

¹⁴ Панель из 12 пробирок на экстракцию.

¹⁵ Экстракция двух стрипов на приборе NucliSENS easyMAG (16 пробирок).

¹⁶ Панель из 24 пробирок на экстракцию, выделение трех стрипов на приборе NucliSENS easyMAG

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** HK2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** HK2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** H-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 31 из 49

Таблица 5

Программа «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа¹⁷

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	50	15 мин	–	1
Hold/Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

Таблица 6

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа¹⁸

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

¹⁷ Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

¹⁸ Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Формат FEP Форма 2: **REF** TV1-S-FEP; **REF** НК2-0192-2; Форма 4: **REF** V1-FEP; **REF** Н-0194-2;

Формат FRT Форма 2: **REF** TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** НК2-0192-1;

Форма 4: **REF** R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); **REF** Н-0194-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 32 из 49

ВНИМАНИЕ! С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для *HBV*, генотипирования *HCV* и др.).

Примечание – Каналы ROX/Orange и Cy5/Red включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *HCV*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

- образец считается **положительным** по содержанию РНК *HCV*, если на канале JOE/HEX/Yellow получено значение

- порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.
- образец считается **отрицательным** по содержанию РНК *HCV*, если на канале JOE/HEX/Yellow отсутствует значение *Ct* или получено значение *Ct* более указанного (граничного) значения, а по каналу ВКО для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.
 - образец считается **сомнительным** в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуется повторное ПЦР-исследование соответствующего образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального времени» и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению наборов реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (*HCV*) «АмплиСенс® *HCV-FL*», РНК вируса гепатита D (*HDV*) «АмплиСенс® *HDV-FL*», РНК вируса гепатита G (*HGV*) «АмплиСенс® *HGV-FL*», ДНК вируса гепатита В (*HBV*) «АмплиСенс® *HBV-FL*».

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат амплификации по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Экстракция РНК, ПЦР	положительный	отрицательный
ПК	Экстракция РНК, ПЦР	положительный	положительный
К+	ПЦР	положительный	положительный
К–	ПЦР	отрицательный	отрицательный

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа экстракции (ПК) или положительного контроля этапа ПЦР (К+) по каналу HEX/Yellow значение *Ct* отсутствует или превышает

указанное (граничное) значение, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.

2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналу HEX/Yellow получено значение *Ct*, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HCV*, начиная с этапа экстракции РНК.

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 разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание ПКО-1-НСV, KB2 НCV и ВКО ICZ-рес более двух раз, после размораживания ПКО-1-НСV, KB2 НCV и ВКО ICZ-рес хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ОТ-ПЦР-смесь-1-FL НCV хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® НCV-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹⁹.

¹⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Е.И. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации



ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК 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 ICZ-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 ICZ-rec** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО ICZ-rec) с последующим разнесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

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 экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HCV**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки (пункт 8 выполнять только в случае одновременной экстракции РНК гепатита С и ДНК гепатита В и/или РНК гепатита D).
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 **12 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 **12 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 на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
20. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарат необходимо хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция РНК 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 ICZ-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 ICZ-rec** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО ICZ-rec) с последующим разнесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

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 экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HCV**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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 **400 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.
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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

(например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

Очищенная РНК 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Экстракция РНК 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 экстракция РНК из 24 образцов:
 - а) во флакон с лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл) внести 0,28 мл ВКО ICZ-рес, все содержимое пробирки с компонентом А (0,6 мл) и все содержимое пробирки с магнетизированной силикой (0,9 мл).

Примечание – При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

- 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 ICZ-рес, компонента А и магнетизированной силики.
4. При экстракции РНК менее чем из 24 образцов:
 - а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл ВКО ICZ-рес, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку 10 мкл ВКО ICZ-рес, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО ICZ-рес, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

Примечание – При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК *HDV*, РНК *HCV*, РНК *HGV*, ДНК *HBV*, РНК ВИЧ и *HCV*-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

- б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО *ICZ-рес*, компонента А и магнетизированной силики.
- в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
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 экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-*HCV***, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
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.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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.
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 РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная РНК 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

Формат FEP Форма 2: [REF](#) TV1-S-FEP; [REF](#) HK2-0192-2; Форма 4: [REF](#) V1-FEP; [REF](#) H-0194-2;

Формат FRT Форма 2: [REF](#) TR-V1-S-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) HK2-0192-1;

Форма 4: [REF](#) R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt); [REF](#) H-0194-1 / [VER](#) 15.02.12 / стр. 46 из 49

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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 ICZ-гес, компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО ICZ-гес, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО ICZ-гес, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

Примечание – При экстракции образца для проведения нескольких различных исследований (допустима одновременная экстракция нуклеиновых кислот для обнаружения РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV, ДНК HBV, РНК ВИЧ и HCV-генотипирования) внести все требуемые препараты ВКО (аналогично).

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО ICZ-гес, 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 экстракции (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HCV**, перемешать на вортексе.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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 вортиксированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**
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 РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная РНК 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.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Максимальное число тестов
	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		