УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 10.04.2012 № 1669-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» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита А (*HAV*)
в клиническом материале и объектах окружающей среды
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *HAV*-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....6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ....7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ....9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК....12
ФОРМАТ FEP....15
СОСТАВ....15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ....18
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ....18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ....19
А. Подготовка пробирок для амплификации....19
Б. Проведение амплификации....21
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»....22
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ....23
Интерпретация результатов в исследуемых образцах....23
Интерпретация результатов в контрольных образцах....24
ФОРМАТ FRT....26
СОСТАВ....26
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ....28
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ....29
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»....30
А. Подготовка пробирок для амплификации....30
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»....31
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ....32
Интерпретация результатов в исследуемых образцах....33
Интерпретация результатов в контрольных образцах....34
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ....36
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Экстракция РНК из образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»....37
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Экстракция РНК из образцов при использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб»....39
Б1. Экстракция из 1000 мкл исследуемого образца....39
Б2. Экстракция из 200 мкл исследуемого образца....41
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Схема приготовления реакционных смесей для формата FEP....44
В1. Приготовление реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «ФОН»....44
В2. Приготовление реакционной смеси при повторном использовании пробирок «фон»....45
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Схема приготовления реакционных смесей для формата FRT....47
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ....48

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+/ВК+	- положительный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	- положительный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
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
HAV	- вирус гепатита А
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита А (*HAV*) в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из плазмы (сыворотки) крови, фекалий и объектов окружающей среды (концентраты (элюаты) проб воды (сточная, питьевая, вода из поверхностных водоемов и т.д.).

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК *HAV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: 1) экстракцию РНК из исследуемого материала, 2) обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК и 3) гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция РНК из

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

исследуемого материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводятся реакция обратной транскрипции (ОТ) и реакция амплификации участка синтезированной кДНК в одном реакционном буфере (ОТ-ПЦР). Реакция амплификации участка кДНК/ДНК *HAV* проводится при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». По каналу соответствующему флуорофору FAM детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца). По каналу соответствующему флуорофору JOE детектируется продукт амплификации кДНК *HAV*. Положительный контрольный образец этапа экстракции ПКО *HAV*-FL-rec детектируется по каналам соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (*HAV*). Контрольный образец амплификации – ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО является комплексным для *HAV* и ВКО и аналогично детектируется по каналам соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (*HAV*).

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки и «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FEP-50 F.
Форма 3 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 и «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.
Форма 4 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 и «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.
Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F.
Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-50 F.
Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала и объектов окружающей среды, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-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 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.
ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:
Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 2 штуки и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.
Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.
Форма 4 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.
Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.
Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.
Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала и объектов окружающей среды, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-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 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Формат	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность, копий/мл
Формат FEP Формат FRT	100	«РИБО-преп»	Плазма (сыворотка) крови; Осветленные экстракты фекалий; Концентраты (элюаты) проб воды	500
	100	NucliSENS easyMAG	Плазма (сыворотка) крови; Концентраты (элюаты) проб воды	500
	200	«МАГНО-сорб»	Плазма (сыворотка) крови; Концентраты (элюаты) проб воды	250
	1000	«МАГНО-сорб»	Плазма (сыворотка) крови; Концентраты (элюаты) проб воды	50

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита B, вирус гепатита C, вирус гепатита D, вирус гепатита E, вирус гепатита G, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус герпеса человека 6 и 8 типов, энтеровирус (Coxsakie B1, B2, B3, B4, B5, B6, Polio I, II, III), ротавирус человека WA, астровирус, норовирус I и II типов, аденовирус (типы 2, 3, 7), *Shigella, Salmonella, Yersinia, Campylobacter, 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 «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 образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, США).
6. Штативы для наконечников (например, Axygen, США) и пробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
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.

<u>При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008)</u>:

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
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 наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axygen, США).

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

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С (например, Bioer Technology, Китай)
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С ((например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
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).
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 для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл (например, Axygen, США).

<u>При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:</u>

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)).

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

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, США).
5. Штативы для наконечников (например, Axygen, США) и пробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

<u>При использовании комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100-FEP F, «ПЦР-комплект» вариант 50-FEP F:</u>

9. Амплификатор, адаптированный для пробирок для ПЦР объемом 0,5 мл, например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или амплификатор, адаптированный для пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл, например, Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axygen, США) или эквивалентный.
10. Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), «Джин» (версия п.о. не ниже 4.4i) («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентный.
11. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (плоская крышка, нестрипованные) объемом 0,2 или 0,5 мл:
    а) объемом 0,2 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл (Gradient Palm Cycler, GeneAmp PCR System 2700, MaxyGene);
    б) объемом 0,5 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР объемом 0,5 мл («Терцик»).

<u>При использовании комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F:</u>

12. 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.
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США) – 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 анализа используется следующий материал:

– плазма (сыворотка) периферической крови;
– фекалии;
– концентраты (элюаты) проб воды (сточная, питьевая, вода из поверхностных водоемов и т.д.);

Контейнер с материалом доставляется в лабораторию в емкости со льдом в течение суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

– **плазма (сыворотка) периферической крови**

Взятие крови проводится утром натощак. Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g, после чего отбирают

плазму и переносят в отдельную одноразовую пробирку. Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 минут при комнатной температуре, после чего отбирают сыворотку и переносят в в отдельную одноразовую пробирку. Хранить плазму (сыворотку) можно не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

– **фекалии**

Для проведения анализа используется осветленный экстракт фекалий. Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 10 тыс. g в течение 5 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость используют для экстракции РНК. При необходимости хранения надосадочную жидкость отбирают в отдельную одноразовую пробирку. Хранить материал можно не более 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно при минус 68 °С. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Примечание – При приготовлении суспензии фекалий необходимо:

1. В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) внести 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида);
2. В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При водянистой консистенции фекалий (прозрачная жидкость) пункты 1, 2 не выполняются.

При необходимости длительного хранения к суспензии добавляют глицерин до конечной концентрации 15 %, тщательно перемешивают, выдерживают при комнатной температуре 1 ч и хранят в замороженном виде.

– **концентраты (элюаты) проб воды**

Образцы концентратов (элюатов) водных проб используют для экстракции вирусной РНК без предварительной обработки. В случае наличия в исследуемых образцах видимых примесей или видимой глазом окраски, данные пробы непосредственно перед анализом тщательно перемешивают на вортексе, после чего производится их центрифугирование в течение 1 мин при 10 тыс g при комнатной температуре. Надосадочную жидкость используют для экстракции РНК. Хранить материал можно не более 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

ФОРМАТ FEP
СОСТАВ

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

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1 (в количестве 2 шт.); входит в в состав формы комплектации 2 (в количестве 1 шт.).

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 бесцветная жидкость[2]	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость[2]	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 объемом 1000 мкл, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

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

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость[2]	25	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость[2]	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	0,6	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб объемом 200 мкл, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита А (*HAV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по конечной точке – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	2 флакона
ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 1, 3, 4 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 *HAV*-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита А (*HAV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по конечной точке – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 2 и 6.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
ПКО *HAV*-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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.

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов:

– **«РИБО-преп»** (входит в состав форм 1 и 2). Объем плазмы (сыворотки) крови и образцов концентратов (элюатов) воды для экстракции РНК – 0,1 мл; объем осветленного экстракта фекалий для экстракции РНК – 0,05 мл. Порядок работы см. в Приложении А.
– **«МАГНО-сорб» вариант 100-1000** (входит в состав формы 3). Объем плазмы (сыворотки) крови и образцов концентратов (элюатов) воды для экстракции РНК – 1,0 мл. Порядок работы см. в Приложении Б пункт Б1.
– **«МАГНО-сорб» вариант 100-200** (входит в состав формы 4). Объем плазмы (сыворотки) крови и образцов концентратов (элюатов) воды для экстракции РНК – 0,2 мл. Порядок работы см. в Приложении Б пункт Б2.
– **автоматическая станция NucliSENS easyMAG**. Возможно использование протоколов, позволяющих проводить экстракцию РНК из **100 мкл исследуемого образца (плазма (сыворотка) периферической крови, концентраты (элюаты) проб воды).** Процедура экстракции проводится в соответствие с инструкцией к автоматической станции NucliSENS easyMAG. Допускается использование режимов лизиса в приборе (***On-board***) и вне прибора (***Off-board***). Обязательным условием является внесение ВКО в образцы до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну

пробу. Программируемый объем элюции – 55 мкл, объем магнитной силики – 20 мкл. После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора.

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР рекомендуется поставить в течение 30 мин после экстракции РНК! Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакции – 25 мкл, 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 анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых, контрольных и фоновых («Фон») образцов, необходимо согласно **расчетной таблицы** (см. приложение ***B***). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца РНК необходимо проводить постановку двух контролей этапа ОТ-ПЦР и двух пробирок «Фон».** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования реагентов.

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 (ОК и ПК), два контроля амплификации (К– и К+/ВК+)) 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 из расчета на 1 реакцию**: 10 мкл ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*, 5 мкл ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT и 0,25 мкл RT-G-mix-2 (см. также приложение *B*, пункт *B1*).** 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-Ревертазы (MMlv)) и по **10 мкл РНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать 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 ºС 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-Ревертазы (MMlv) (см. также приложение *B*, пункт *B1*).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов **полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMlv)**, указанное в **расчетной таблице приложения *B* (пункт *B1*)**, 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-смесь-1-FEP/FRT *HAV*, 5 мкл ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, **0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы**

(MMlv) (см. также приложение *B*, пункт *B2*). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

7. Внести в оставшиеся пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси. Сверху добавить по 1 капле **минерального масла для ПЦР**.
8. Под масло или непосредственно на поверхность масла в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл** пробы РНК, выделенной из клинических или контрольных образцов, используя отдельный наконечник с фильтром для каждой пробы.
9. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
   б) **положительный контроль ПЦР** (**К+/ВК+)** – контроль амплификации кДНК *HAV* и детекции по каналу HEX и контроль амплификации кДНК ВКО и детекции по каналу FAM – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО**.

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

Б. Проведение амплификации

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

Таблица 1

Программа амплификации кДНК *HAV*

Для амплификаторов с активным регулированием[3]				Для амплификаторов с матричным регулированием[4]			
цикл	температура, °С	время	циклов	цикл	температура, °С	время	циклов
1	**50**	30 мин	1	1	**50**	30 мин	1
2	**95**	15 мин	1	2	**95**	15 мин	1
3	**95**	10 с	42	3	**95**	20 с	42
	60	10* или 15**с			**60**	25 с	
	72	10* или 15**с			**72**	25 с	
4	**10**	Хранение		4	**10**	Хранение	

2. По окончании выполнения программы приступить к детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

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

— по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации РНК *HAV*.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® *HAV*-FL» формат FEP, разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

[3] Например, *«Терцик» («ДНК-Технология»), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer); **Gradient Palm Cycler (Corbett Research), MaxyGene (AXYGEN Scientific), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

[4] Например, PTC-100 (MJ Research), Uno-2 (Biometra).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

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

Принцип интерпретации результатов следующий (см. табл. 2):

— **РНК *HAV* обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения положительного результата.

— **РНК *HAV* не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.

— Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, и сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения.

Если для пробы получен **невалидный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца.

— Результат анализа **сомнительный,** если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями).

Если для пробы получен **сомнительный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этим образцам – результат считается сомнительным.

Таблица 2

Оценка результатов анализа для исследуемых образцов

Результат по уровню флуоресценции		Результат	Примечание
Канал FAM (ВКО)	**Канал HEX (Специфика)**		
Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	РНК *HAV* обнаружена	В пробе выявлена РНК *HAV*
Ниже порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	РНК *HAV* обнаружена	В пробе выявлена РНК *HAV*
Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	РНК *HAV* не обнаружена	В пробе не выявлена РНК *HAV*
Выше порогового значения	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Сомнительный	Проба требует повторной экстракции и тестирования
Ниже порогового значения	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Сомнительный	Проба требует повторной экстракции и тестирования
Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Невалидный	Проба требует повторной экстракции и тестирования

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации, а также положительного и отрицательного контроля экстракции РНК, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	**Контролируемый этап ПЦР-исследования**	**Сигнал по каналу**		**Обозначение результата в программах некоторых детекторов**
		FAM	**HEX**	
ОК	Экстракция РНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	«–» или «ОК»
ПК	Экстракция РНК	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»
К–	ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	«нд» или «ОК»
К+/ ВК+	ПЦР	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) сигнал HEX ниже порогового значения положительного результата, необходимо провести анализ повторно для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HAV*, начиная с этапа экстракции РНК из исследуемого материала.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+/ВК+) сигнал HEX ниже порогового значения положительного результата, необходимо провести анализ повторно для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HAV*, начиная с этапа ОТ-ПЦР.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал по каналу HEX выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HAV*, начиная с этапа экстракции РНК.

ФОРМАТ FRT
СОСТАВ

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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[5]	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.); входит в состав формы комплектации 2 (в количестве 1 шт.).

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 бесцветная жидкость[5]	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость[5]	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 объемом 1000 мкл, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

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

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость[5]	25	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость[5]	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	0,6	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб объемом 200 мкл, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита А (*HAV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 3, 4 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 *HAV*-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса гепатита А (*HAV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 2 и 6.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
ПКО *HAV*-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО STI-248-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.

- Проведение обратной транскрипции и амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов:

- **«РИБО-преп»** (входит в состав форм 1 и 2). Объем плазмы (сыворотки) крови и образцов концентратов (элюатов) воды для экстракции РНК – 0,1 мл; объем осветленного экстракта фекалий для экстракции РНК – 0,05 мл. Порядок работы см. в Приложении А.
- **«МАГНО-сорб» вариант 100-1000** (входит в состав формы 3). Объем плазмы (сыворотки) крови и образцов концентратов (элюатов) воды для экстракции РНК – 1,0 мл. Порядок работы см. в Приложении Б пункт Б1.
- **«МАГНО-сорб» вариант 100-200** (входит в состав формы 4). Объем плазмы (сыворотки) крови и образцов концентратов (элюатов) воды для экстракции РНК – 0,2 мл. Порядок работы см. в Приложении Б пункт Б2.
- **автоматическая станция NucliSENS easyMAG**. Возможно использование протоколов, позволяющих проводить экстракцию РНК из **100 мкл исследуемого образца (плазма (сыворотка) периферической крови, концентраты (элюаты) проб воды).** Процедура экстракции проводится в соответствие с инструкцией к автоматической станции NucliSENS easyMAG. Допускается использование режимов лизиса в приборе (***On-board***) и вне прибора (***Off-board***). Обязательным условием является внесение ВКО в образцы до начала экстракции в объёме 10 мкл на одну пробу. Программируемый объем элюции – 55 мкл, объем магнитной силики – 20 мкл. После окончания экстракции РНК, извлечь пробирки из прибора.

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР рекомендуется поставить в течение 30 мин после экстракции РНК! Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакции – 25 мкл, 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 анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице (см. приложение Г)**. Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца РНК необходимо проводить постановку двух контролей этапа ОТ-ПЦР.** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования реагентов.

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 исследуемых и контрольных образцов РНК и

кДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.

3. **Для приготовления реакционной смеси** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать из расчета на 1 реакцию: **10 мкл ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*, 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 (MMlv) (см. также приложение Г).** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в пробирки по **15 мкл готовой реакционной смеси.**
5. Используя отдельный наконечник с фильтром для каждой пробы, добавить по **10 мкл** РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов, в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
   а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
   б) положительный контроль ПЦР (**К+/ВК+)** – контроль ПЦР кДНК *HAV* и детекции по каналу JOE/Yellow/HEX и контроль ПЦР кДНК ВКО и детекции по каналу FAM/Green) – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *HAV*-FL / ВКО**.

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. 4 и 5).

Таблица 4

Программа амплификации «АмплиСенс-3» для приборов роторного типа[6]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow/HEX	
	72	15 с	–	

Таблица 5

Программа амплификации «АмплиСенс-3» для приборов планшетного типа[7]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
1	50	30 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/JOE	
	72	15 с	–	

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

[7] Например, iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

- по каналу **FAM/Green** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ВКО,
- по каналу **JOE/Yellow/HEX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации РНК *HAV*.

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

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **РНК *HAV* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов значение порогового цикла (*Ct* или *Cp*) для канала **JOE/Yellow/HEX** не превышает значения, указанного во вкладыше к набору реагентов. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **РНК *HAV* не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow/HEX** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу **FAM/Green** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее значение, указанное во вкладыше к набору реагентов.
- **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу **JOE/Yellow/HEX**, и по каналу **FAM/Green** значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае необходимо провести анализ данного образца повторно, начиная с этапа экстракции РНК из исследуемого материала
- **сомнительный**, если в таблице результатов по каналу **JOE/Yellow/HEX** для него определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное во вкладыше. В этом

случае требуются провести анализ данного образца повторно, начиная с этапа выделения РНК из исследуемого материала. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении отрицательного результата по этому образцу – результат считается сомнительным.

(см. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального времени» и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» формат FRT).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты положительных и отрицательных контролей ПЦР и экстракции РНК (см. табл. 6). Результаты по положительным и отрицательным контрольным образцам не должны превышать значений пороговых циклов, указанных во вкладыше к комплекту реагентов.

Таблица 6

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение *Ct* по каналу	
		JOE/Yellow/HEX	FAM/Green
ОК	Экстракция РНК	не определено	≤ **В1**
ПК	Экстракция РНК	≤ **К1**	≤ **В1**
К–	ПЦР	не определено	не определено
К+/ВК+	ПЦР	**≤ К2**	**≤ В2**

К1, К2, В1 и **В2** – значения пороговых циклов, указанных во вкладыше к комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) значение порогового цикла по каналу **JOE/Yellow/HEX** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо провести анализ повторно для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HAV*, начиная с этапа экстракции РНК из исследуемого материала.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+/ВК+) значение порогового цикла по каналу **JOE/Yellow/HEX** отсутствует

или превышает граничное значение, необходимо провести анализ повторно для всех образцов, в которых не обнаружена РНК *HAV*, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

3. Если в отрицательном контроле экстракции РНК (ОК) и/или в отрицательном контроле ПЦР (К–) на канале **JOE/Yellow/HEX** детектируется положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *HAV*, начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 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 «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплекты реагентов «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF) и ТМ-Ревертазу (MMlv) (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV* хранить в защищенном от света месте.

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

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

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

Управления делами Президента Российской Федерации

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

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Экстракция РНК из образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО STI-248-rec)**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. При экстракции РНК вируса гепатита А **из фекалий** внести дополнительно в каждую пробирку, предназначенную для исследуемого образца, по **50 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО)**.
4. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО**, внести по **100 мкл пробы** (**50 мкл**, в случае исследования **фекалий)**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл положительного контрольного образца (ПКО *HAV*-FL-rec)**. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
6. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
7. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок,

переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

10. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **13 тыс об/мин** 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. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
17. Центрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК (проба РНК). Указанный материал готов к постановке обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.
Экстракция РНК из образцов при использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

Б1. Экстракция из 1000 мкл исследуемого образца
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. <u>При экстракции РНК из 24 образцов</u>:
   а) во флакон с **лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл)** внести 0,28 мл **ВКО STI-248-rec (0,28 мл),** 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, компонента А и магнетизированной силики.**
4. <u>При экстракции РНК менее чем из 24 образцов:</u>
   а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО STI-248-rec**, **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-248-rec, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО STI-248-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-248-rec, 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** и перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. Для каждой панели необходимо поставить положительный контроль (ПК). Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **0,01 мл ПКО *HAV*-FL-rec и 0,1 мл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль (ОК). Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **0,1 мл 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 наконечники 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.
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 **50 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 очищенной РНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.

После отбора надосадочной жидкости в пробирки пробы РНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С; пробы РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес при температуре не выше минус 16 °С или в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

Б2. Экстракция из 200 мкл исследуемого образца

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-248-rec**, **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-248-rec, 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 STI-248-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-248-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 пробирку с лизирующим раствором добавить **10 мкл ПКО *HAV*-FL-rec и 90 мкл ОКО**, перемешать на вортексе.
8. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль (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.
10. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
11. Используя наконечник 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.
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**.
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 **50 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 очищенной РНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.

Пробы РНК не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С.

ПРИЛОЖЕНИЕ В.

Схема приготовления реакционных смесей для формата FEP

В1. Приготовление реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «ФОН»

Общий объем реакции – 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию – 15 мкл Объем пробы РНК – 10 мкл						
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Количество выделенных образцов*	Число реакций**	Этап 1. Приготовление смеси, состоящей из трех компонентов			Этап 2. Внесение ферментов после отбора смеси на 2 образца «ФОН»	
		ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)***	ТМ-Ревертаза (MMlv)***
4	8	80	40	2,0	3,0	1,5
6	10	100	50	2,5	4,0	2,0
8	12	120	60	3,0	5,0	2,5
10	14	140	70	3,5	6,0	3,0
12	16	160	80	4,0	7,0	3,5
14	18	180	90	4,5	8,0	4,0
16	20	200	100	5,0	9,0	4,5
18	22	220	110	5,5	10,0	5,0
20	24	240	120	6,0	11,0	5,5
22	26	260	130	6,5	12,0	6,0
24	28	280	140	7,0	13,0	6,5
26	30	300	150	7,5	14,0	7,0
28	32	320	160	8,0	15,0	7,5
30	34	340	170	8,5	16,0	8,0
32	36	360	180	9,0	17,0	8,5
34	38	380	190	9,5	18,0	9,0
36	40	400	200	10,0	19,0	9,5
38	42	420	210	10,5	20,0	10,0
40	44	440	220	11,0	21,0	10,5
42	46	460	230	11,5	22,0	11,0
44	48	480	240	12,0	23,0	11,5
46	50	500	250	12,5	24,0	12,0
48	52	520	260	13,0	25,0	12,5
50	54	540	270	13,5	26,0	13,0

* **N+2K** – включает количество исследуемых образцов (**N**) и два контроля этапа экстракции РНК - **2K** (ОК и ПК).

** **N+2K+2K$_{ПЦР}$+2Ф** - включает количество исследуемых образцов (**N**), два контроля этапа экстракции РНК (**2K**), два контроля этапа ОТ-ПЦР - **2K$_{ПЦР}$** (К+/ВК+) и две пробирки

«Фон» (**2Ф**).

*** **Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TagF) и ТМ-Ревертазы (MMlv), указанное в расчетной таблице, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».**

В2. Приготовление реакционной смеси при повторном использовании пробирок «фон»

ВНИМАНИЕ! 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.

Общий объем реакции – 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию – 15 мкл Объем пробы РНК – 10 мкл						
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		**10,00**	**5,00**	**0,25**	**0,50**	**0,25**
Число исследуемых образцов*	**Число реакций****	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV***	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**	**RT-G-mix-2**	**Полимераза (TaqF)**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
4	**6**	**60**	**30**	**1,5**	**3,0**	**1,5**
6	**8**	**80**	**40**	**2,0**	**4,0**	**2,0**
8	**10**	**100**	**50**	**2,5**	**5,0**	**2,5**
10	**12**	**120**	**60**	**3,0**	**6,0**	**3,0**
12	**14**	**140**	**70**	**3,5**	**7,0**	**3,5**
14	**16**	**160**	**80**	**4,0**	**8,0**	**4,0**
16	**18**	**180**	**90**	**4,5**	**9,0**	**4,5**
18	**20**	**200**	**100**	**5,0**	**10,0**	**5,0**
20	**22**	**220**	**110**	**5,5**	**11,0**	**5,5**
22	**24**	**240**	**120**	**6,0**	**12,0**	**6,0**
24	**26**	**260**	**130**	**6,5**	**13,0**	**6,5**
26	**28**	**280**	**140**	**7,0**	**14,0**	**7,0**
28	**30**	**300**	**150**	**7,5**	**15,0**	**7,5**
30	**32**	**320**	**160**	**8,0**	**16,0**	**8,0**
32	**34**	**340**	**170**	**8,5**	**17,0**	**8,5**
34	**36**	**360**	**180**	**9,0**	**18,0**	**9,0**
36	**38**	**380**	**190**	**9,5**	**19,0**	**9,5**
38	**40**	**400**	**200**	**10,0**	**20,0**	**10,0**
40	**42**	**420**	**210**	**10,5**	**21,0**	**10,5**
42	**44**	**440**	**220**	**11,0**	**22,0**	**11,0**
44	**46**	**460**	**230**	**11,5**	**23,0**	**11,5**
46	**48**	**480**	**240**	**12,0**	**24,0**	**12,0**
48	**50**	**500**	**250**	**12,5**	**25,0**	**12,5**
50	**52**	**520**	**260**	**13,0**	**26,0**	**13,0**
52	**54**	**540**	**270**	**13,5**	**27,0**	**13,5**

* **N+2K** – включает количество исследуемых образцов (**N**) и два контроля этапа экстракции РНК - **2K** (ОК и ПК).

** **N+2K+2K$_{ПЦР}$** - включает количество исследуемых образцов (**N**), два контроля этапа экстракции РНК (**2K**) и два контроля этапа ОТ-ПЦР - **2K$_{ПЦР}$** (К+/ВК+).

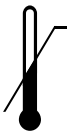
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.
Схема приготовления реакционных смесей для формата FRT

Общий объем реакции – 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию – 15 мкл Объем пробы РНК – 10 мкл						
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число исследуемых образцов*	Число реакций **	ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *HAV*	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMlv)
4	6	60	30	1,5	3,0	1,5
6	8	80	40	2,0	4,0	2,0
8	10	100	50	2,5	5,0	2,5
10	12	120	60	3,0	6,0	3,0
12	14	140	70	3,5	7,0	3,5
14	16	160	80	4,0	8,0	4,0
16	18	180	90	4,5	9,0	4,5
18	20	200	100	5,0	10,0	5,0
20	22	220	110	5,5	11,0	5,5
22	24	240	120	6,0	12,0	6,0
24	26	260	130	6,5	13,0	6,5
26	28	280	140	7,0	14,0	7,0
28	30	300	150	7,5	15,0	7,5
30	32	320	160	8,0	16,0	8,0
32	34	340	170	8,5	17,0	8,5
34	36	360	180	9,0	18,0	9,0
36	38	380	190	9,5	19,0	9,5
38	40	400	200	10,0	20,0	10,0
40	42	420	210	10,5	21,0	10,5
42	44	440	220	11,0	22,0	11,0
44	46	460	230	11,5	23,0	11,5
46	48	480	240	12,0	24,0	12,0
48	50	500	250	12,5	25,0	12,5
50	52	520	260	13,0	26,0	13,0
52	54	540	270	13,5	27,0	13,5

* **N+2K** – включает количество исследуемых образцов (**N**) и два контроля этапа экстракции РНК - **2K** (ОК и ПК).

** **N+2K+2K$_{ПЦР}$** - включает количество исследуемых образцов (**N**), два контроля этапа экстракции РНК (**2K**) и два контроля этапа ОТ-ПЦР - **2K$_{ПЦР}$** (К+/ВК+).

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

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