

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

В.Г. Акимкин

«11» октября 2021г.

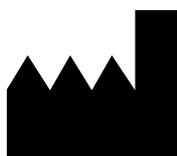


ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® РНК/ДНК-ВИЧ-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК.....	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	19
СОСТАВ.....	22
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	25
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	26
Подготовка проб для ОТ-ПЦР при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT (форма 1).....	26
Подготовка проб для ОТ-ПЦР при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT- L (форма 2).....	28
Подготовка проб для ОТ-ПЦР при использовании «пцр-комплекта» вариант FRT- LA (форма 3)	28
Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	30
Анализ и интерпретация результатов.....	31
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	35
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	37
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	38
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	39
Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» из образцов цельной крови	39
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	42
Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» из 100 мкл образцов плазмы/сыворотки крови	42
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	45
Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» из 1000 мкл образцов плазмы/сыворотки крови	45
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	49
Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» из 200 мкл образцов цельной крови, плазмы/сыворотки крови	49
ПРИЛОЖЕНИЕ 5.....	53
ПРИЛОЖЕНИЕ 6.....	54

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВИЧ-1	- вирус иммунодефицита человека типа 1
ВКО	- внутренний контрольный образец
ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
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
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® РНК/ДНК-ВИЧ-FL предназначен для качественного определения вирусной РНК и провирусной ДНК ВИЧ-1 в биологическом материале (цельная кровь, плазма крови и сыворотка крови) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР служат пробы РНК/ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на ВИЧ-инфекцию, вызванной вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК и ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО), проведении обратной транскрипции РНК ВИЧ-1 и амплификации участков кДНК/ДНК ВИЧ-1 и кДНК экзогенного и/или ДНК эндогенного ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Экстракция РНК/ДНК из биологического материала проводится в присутствии экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО), который позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. При экстракции РНК/ДНК из биологического материала, содержащего клетки человека (цельная кровь), происходит амплификация участка ДНК β -глобинового гена человека (эндогенного внутреннего контроля). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента ревертазы (MMIv).

Амплификация участков ДНК/кДНК проводится при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК/кДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности

флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводится обратная транскрипция и амплификация двух различных участков генома ВИЧ, а также амплификация последовательности кДНК ВКО и участка ДНК человека (ВКО Glob). Результаты амплификации регистрируются по трём различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК/ДНК-мишень	кДНК ВКО	кДНК/ДНК ВИЧ-1	ДНК ВКО Glob
Область амплификации	Генно-инженерный конструкт	Область гена <i>pol</i> , область 5'UTR	β-глобиновый ген

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «Гемолитик» (1 флакон), «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 2: «Гемолитик» (1 флакон), «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA

Формы 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего предобработку биологического материала (цельная кровь), экстракцию РНК/ДНК из биологического материала (цельная кровь, плазма крови и сыворотка крови), проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК/ДНК ВИЧ-1 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК/ДНК из биологического материала (цельная кровь, плазма крови и сыворотка крови), проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК/ДНК ВИЧ-1 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма 1 может быть использована совместно с автоматическими станциями приготовления реакционных смесей.

Форма 3 может быть использована совместно с

автоматическими станциями пробоподготовки и приготовления реакционных смесей.

Формы 1 и 3 рассчитаны на проведение 100 тестов, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 96 тестов, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), РНК ВИЧ-1, копий/мл	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ДНК ВИЧ-1, копий/мл
Цельная кровь	200	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	125	125
		«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-LA	500	500
Плазма/сыворотка крови	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	200	–
	200	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-LA	125	–
	1000			25	–

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет РНК/ДНК ВИЧ-1 различных субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм (CRF). Были исследованы образцы различных субтипов ВИЧ-1 групп М, N и О и CRF из панелей генотипов ВИЧ-1 (NIBSC code: 12/224; NIBSC code: 13/214) в концентрации не более 1×10^5 копий/мл и не менее 1×10^3 копий/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов/вирусов в концентрации не более 1×10^7 копий/мл (ГЭ/мл) и не менее 1×10^3 копий/мл (ГЭ/мл): *HIV-2* (вирус иммунодефицита человека 2 типа) (NIBSC code: 08/150), *HAV* (вирус гепатита А) (NIBSC code: 00/562), *HBV* (вирус гепатита В) (NIBSC code: 10/264), *HCV* (вирус гепатита С) (NIBSC code: 14/150), *CMV* (цитомегаловирус) (NIBSC code: 09/162), *EBV* (вирус Эпштейна-Барр) (NIBSC code: 09/260), *VZV* (вирус ветряной оспы) (NIBSC code: W1044), *HHV-6B* (вирус герпеса человека типа 6) (NIBSC code: 15/266), *Parvovirus B19* (парвовирус В19) (NIBSC code: 99/800), *HAdV-2* (аденовирус типа 2) (NIBSC code: 16/324), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™), *Streptococcus agalactiae* (ATCC® 12386™) и ДНК человека (Sigma Aldrich, США) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл.

При тестировании образцов РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартный образец предприятия, содержащий РНК ВИЧ с концентрацией $1,38 \times 10^4$ копий/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в

одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

АмплиСенс® РНК/ДНК ВИЧ-FL	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Форма 1	Положительные	10	100	30	100
	Отрицательные	10	100	30	100
Форма 2	Положительные	10	100	30	100
	Отрицательные	10	100	30	100
Форма 3	Положительные	10	100	30	100
	Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы 204 образца цельной крови, 159 образцов плазмы крови и 279 образцов сыворотки крови.

Для определения диагностической чувствительности использовался биологический материал от пациентов с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции. Для определения диагностической специфичности использовался биологический материал от здоровых пациентов.

**Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® РНК/ДНК ВИЧ-FL в сравнении с референтным
методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® РНК/ДНК ВИЧ-FL		Результаты применения референтного метода/метода сравнения	
			положительных ¹	отрицательных ¹
Цельная кровь	Всего исследовано 204 образцов	положительных	132	0
		отрицательных	0	72
Плазма крови	Всего исследовано 159 образцов	положительных	114	0
		отрицательных	0	45
Сыворотка крови	Всего исследовано 279 образцов	положительных	193	0
		отрицательных	0	86

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® РНК/ДНК ВИЧ-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %), %	Диагностическая специфичность ³ , (с доверительной вероятностью 95 %), %
цельная кровь	100 (97,9-100)	100 (96,1-100)
плазма крови	100 (98-100)	100 (93,9-100)
сыворотка крови	100 (98,6-100)	100 (96,8-100)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-

¹ В качестве методов сравнения использовались наборы реагентов «МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГАТ», НПО «Диагностические системы», Россия (РУ № ФСР 2011/10182 от 06.09.2017 г.) и «ИФА-Блот-ВИЧ-1», ЗАО "ЭКОлаб", Россия (РУ № РЗН 2014/1704 от 30.05.2018).

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом/методом сравнения.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом/методом сравнения.

эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» 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».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при

необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов и Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).
2. Центрифуга с охлаждением до 24 тыс g (например, Hettish, Германия, или аналогичная).
3. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша, или аналогичная).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

При работе с цельной кровью:

5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объёмом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А (например, «БВВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
11. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
12. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой

для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).

13. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
15. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
16. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов

При работе с формами 1, 2, включающими комплект реагентов «РИБО-преп»:

17. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
20. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
21. Ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
22. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичные).
23. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
24. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный).
25. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
26. Автоматические дозаторы переменного объема (например,

ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

27. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

28. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

29. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При работе с формой 3, включающей комплект реагентов «МАГНО-сорб»:

30. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

31. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

32. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

33. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

34. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

35. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

36. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

37. Ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

38. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

39. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).

40. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С

(например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).

41. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и/или объемом 5 мл, диаметром 12 мм (например, Promega, США).
42. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», Россия).
43. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
44. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
45. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
46. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот – при работе с формой 3:

47. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа»⁵ (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария) и другие, рекомендованные Изготовителем).
48. Набор необходимых расходных материалов к данной автоматической станции.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

49. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектами» вариант FRT и вариант FRT-LA:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с

⁵ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

50. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
51. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
52. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
53. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
54. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
55. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), QuantStudio 5 (Thermo, США) и другие, рекомендованные Изготовителем).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы цельной крови, плазмы крови и сыворотки крови.

Цельная кровь

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с 6 % раствором ЭДТА или с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция РНК/ДНК станет невозможной).

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения предобработки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 часов.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови. Допускается транспортирование цельной крови при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 часов.

Плазма крови

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8 – 1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с 6 % раствором ЭДТА или с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция РНК/ДНК станет невозможной).

Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800 – 1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Допускается транспортирование плазмы крови при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

Сыворотка крови

Взятие крови проводится утром натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) без антикоагулянта или с кремнеземом в качестве активатора свертывания.

Пробирки отстаивают при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) в течение 30 минут до полного образования сгустка

или помещают в термостат при 37°C на 15 минут. Затем центрифугируют при 800 – 1600 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Допускается хранение образцов сыворотки крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Допускается транспортирование сыворотки крови при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК

Образцы цельной крови:

- не требуют предварительной подготовки при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000;
 - требуют предварительной подготовки при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» вариант 100.
1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом на 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками для обработки необходимого количества образцов крови. Промаркировать пробирки.
 2. В пробирки, предназначенные для исследуемых проб, добавить по **500 мкл гемолитика** и по **200 мкл** исследуемой цельной крови соответственно маркировке. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
 3. Оставить пробирки при температуре от **18 °С до 25 °С** на **3 мин**, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить еще на **3 мин**. Перемешать на вортексе.
 4. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **2 мин** при 8 тыс об/мин.

5. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
6. К полученному осадку в пробирках добавить по **500 мкл гемолитика**. Закрывать пробирки и перемешать содержимое пробирок на вортексе до полного ресуспендирования клеток.
7. Оставить пробирки при температуре от **18 до 25 °C** на **3 мин**, затем еще раз перемешать содержимое пробирок на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **2 мин** при 8 тыс об/мин.
9. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.

ВНИМАНИЕ! Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован или заморожен.

Допускается хранение до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 года.
- при температуре не выше 68 °C – длительно.

Образцы плазмы крови и сыворотки крови не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

- образцы плазмы и сыворотки крови с гемолизом;
- образцы плазмы и сыворотки крови, подвергшиеся многократному замораживанию-оттаиванию;
- образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке;
- образцы сыворотки крови, взятые в пробирки с антикоагулянтом;

Сведения о других интерферирующих веществах при условии соблюдения правил взятия и предварительной подготовки исследуемого материала, указанных в инструкции, отсутствуют.

Для контроля эффективности экстракции РНК/ДНК, ОТ и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (цельная кровь, плазма крови), используемом для исследования (табл. 6).

Были протестированы:

- модельные образцы ВИЧ-негативной цельной крови и плазмы крови без добавления и с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, превышающих верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ в цельной крови и плазме крови (см. табл.6). В модельные образцы ВИЧ-негативной плазмы крови и цельной крови добавляли стандартный образец предприятия, содержащий РНК ВИЧ с концентрацией $1,38 \times 10^4$ копий/мл.
- образцы цельной крови от лиц, больных ВИЧ-инфекцией и здоровых доноров, взятые в пробирки с гепарином и в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянтов;
- модельные образцы плазмы крови, полученные от лиц, больных ВИЧ-инфекцией с подавленной вирусной нагрузкой (ниже 20 копий/мл), принимающих препараты антиретровирусной терапии (тенофовир (TDF), ламивудин (ЗТС), эфавиренз (EFV), фосфазид (PhAZT), лопинавир/ритонавир (LPV/r), абакавир (ABC), долутегравир (DTG), зидовудин (AZT), ралтегравир (RAL), азитромицин и валацикловир). В модельные образцы плазмы крови добавляли стандартный образец предприятия, содержащий РНК ВИЧ с концентрацией $1,38 \times 10^4$ копий/мл.

Таблица 6

Вид биологического материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент (протестированная концентрация в образце)	Наличие интерференции
Цельная кровь	Эндогенные вещества	Гемоглобин (250 г/л)	Не обнаружено
		Триглицериды (37 ммоль/л)	Не обнаружено
		Билирубин (210 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Белок (120 г/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Литий гепарин (12 МЕ/мл)	Обнаружено
		Калий ЭДТА (2 мг/мл)	Не обнаружено
Плазма крови	Эндогенные вещества	Гемоглобин (5 г/л)	Не обнаружено
		Триглицериды (37 ммоль/л)	Не обнаружено
		Билирубин (210 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Белок (120 г/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	TDF (300 мг/сут)+3ТС (300 мг/сут)+EFV (600 мг/сут)	Не обнаружено
		PhAZT (800 мг/сут) + 3ТС (300 мг/сут) + LPV/r (800/200 мг/сут)	Не обнаружено
		ABC (600 мг/сут) +3ТС (300 мг/сут)+DTG (50 мг/сут)	Не обнаружено
		AZT (600 мг/сут)+3ТС (300 мг/сут)+RAL (800 мг/сут)	Не обнаружено
		Азитромицин (500 мг/сут)	Не обнаружено
		Валацикловир (2 г/сут)	Не обнаружено

Оценка потенциальной интерференции была определена для трех форм комплектации набора реагентов.

СОСТАВ

«Гемолитик» – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

Реагент входит в состав форм 1 и 2.

«РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ⁶	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов входит в состав форм 1 и 2.

«МАГНО-сорб» вариант 100-1000 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная жидкость от бесцветного до желтого или розового цвета ⁷	90	3 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная жидкость от бесцветного до желтого или розового цвета ⁷	75	2 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	87	1 флакон
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	35	1 флакон

⁶ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

⁷ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

СОСТАВ

Магнетизированная силика	Суспензия магнитных частиц	1,5	2 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,25	8 пробирок

Комплект реагентов входит в состав формы 3.

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК/ДНК ВИЧ-1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,4	4 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ПКО РНК/ДНК ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов входит в состав формы 1.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК/ДНК ВИЧ-1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь РНК/ДНК ВИЧ-Луо	Порошок белого цвета	–	96 пробирок объемом 0,2 мл
ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ	Порошок белого цвета	–	4 пробирки
ВКОЛ	Порошок белого цвета	–	4 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	9 пробирок

Комплект реагентов входит в состав формы 2.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-LA – комплект реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК/ДНК ВИЧ-1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,4	4 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Смесь ОТ-ПЦР-ферментов	Порошок белого цвета	–	4 пробирки
Восстановитель ферментов	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ	Порошок белого цвета	–	4 пробирки
ВКОЛ	Порошок белого цвета	–	4 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	9 пробирок

Комплект реагентов входит в состав формы 3.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК/ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК/ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- **«РИБО-преп»** вариант 100 для экстракции РНК/ДНК из цельной крови в соответствии с **Приложением 1**, из плазмы крови и сыворотки крови в соответствии с **Приложением 2**.
- **«МАГНО-сорб»** вариант 100-1000 для экстракции РНК/ДНК из 1000 мкл плазмы крови и сыворотки крови в соответствии с **Приложением 3**, из 200 мкл цельной крови, плазмы крови и сыворотки крови в соответствии с **Приложением 4**.

Каждая индивидуальная постановка должна сопровождаться постановкой двух контролей: отрицательного контроля экстракции (**ОК**) и положительного контроля экстракции (**ПК**). В качестве отрицательного контроля экстракции (**ОК**) используют реагент **ОКО**, в качестве положительного контроля экстракции (**ПК**) используют реагент **ПКО РНК/ДНК ВИЧ** или восстановленный **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ**.

Экстракция РНК/ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL** или восстановленного **ВКОЛ**.

Подготовка лиофилизированных контролей

ВНИМАНИЕ! При использовании форм 2 и 3 необходимо предварительно восстановить лиофилизированные контроли.

1. Достать лиофилизированные реагенты **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ** и **ВКОЛ**. Содержимое пробирок с контролями осадить на

вортексе, аккуратно открыть крышки и, избегая распыления содержимого, добавить **ОКО** в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7

Название контроля	Добавить ОКО, мкл
ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ	1200
ВКОЛ	300

2. Плотнo закрыть пробирки и оставить их на 2 мин при температуре от 18 до 25 °С, периодически перемешивая на вортексе.
3. После полного растворения осадить содержимое пробирок на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.

ВНИМАНИЕ! Восстановленные реагенты **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ** и **ВКОЛ** хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

Подготовка проб для ОТ-ПЦР при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT (форма 1)

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы РНК/ДНК – 25 мкл.

1. Определить по схеме приготовления реакционных смесей (Приложение 5) количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **15 мкл ПЦР-смеси-FL РНК/ДНК ВИЧ, 10 мкл ПЦР-буфера-В, 1 мкл полимеразы (TaqF) и 0,5 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (два контроля

экстракции в одном повторе при каждой постановке) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Перемешать на вортексе содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL РНК/ДНК ВИЧ** и **ПЦР-буфером-В**, осадить капли с крышек всех пробирок на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL РНК/ДНК ВИЧ**, **ПЦР-буфера-В**, **полимеразы (TaqF)** и **ТМ-Ревертазы (MMiv)**. Тщательно перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР РНК и амплификации кДНК/ДНК исследуемых и контрольных образцов.
5. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб РНК/ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК/ДНК ВИЧ**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** реагента, в котором проводится элюция РНК/ДНК.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК/ДНК-пробы.

Подготовка проб для ОТ-ПЦР при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L (форма 2)

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы РНК/ДНК – 50 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью РНК/ДНК ВИЧ-Луо** для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов (два контроля экстракции в одном повторе при каждой постановке, количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **50 мкл проб РНК/ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
3. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **50 мкл** реагента, в котором проводилась элюция РНК/ДНК.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК/ДНК-пробы.

Подготовка проб для ОТ-ПЦР при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA (форма 3)

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы РНК/ДНК – 25 мкл.

1. Определить по схеме приготовления реакционных смесей (**Приложение 6**) количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию

требуется **15 мкл ПЦР-смеси-FL РНК/ДНК ВИЧ**, **10 мкл ПЦР-буфера-В** и **2 мкл** восстановленной **Смеси ОТ-ПЦР-ферментов**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (два контроля экстракции в одном повторе при каждой постановке) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Перемешать на вортексе содержимое нелиофилизированных реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В пробирку со **Смесью ОТ-ПЦР-ферментов** добавить **60 мкл Восстановителя ферментов**. Тщательно перемешать смесь **пипетированием** и осадить капли с крышки пробирки на вортексе. Приготовленная смесь хранится при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 3 месяцев.
4. В отдельной одноразовой пробирке смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL РНК/ДНК ВИЧ**, **ПЦР-буфера-В** и восстановленной **Смеси ОТ-ПЦР-ферментов**. Тщательно перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
5. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов.
6. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
7. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл проб РНК/ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК/ДНК, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы,

экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** реагента, в котором проводилась элюция РНК/ДНК.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК/ДНК-пробы.

Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9).

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁸ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	52	20 с	–	
	72	30 с	–	
4	95	10 с	–	40
	55	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с	–	

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов планшетного⁹ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	52	20 с	–	
	72	30 с	–	
4	95	10 с	–	40
	55	30 с	FAM, JOE, ROX	
	72	30 с	–	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трём каналам:

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
При исследовании цельной крови			
Продукт амплификации	кДНК ВКО	кДНК/ДНК ВИЧ-1	ДНК ВКО Glob
При исследовании плазмы крови, сыворотки крови			
Продукт амплификации	кДНК ВКО	кДНК ВИЧ-1	–

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК/ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			Результат
FAM	JOE	ROX	
При исследовании цельной крови			
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК/ДНК ВИЧ-1 НЕ обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК/ДНК ВИЧ-1 обнаружена
отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> или отсутствует	<u>определено</u> или отсутствует	Невалидный*
<u>определено</u> или отсутствует	<u>определено</u> или отсутствует	отсутствует или больше граничного	Невалидный*
При исследовании плазмы крови, сыворотки крови			
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	–	РНК ВИЧ-1 НЕ обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–	РНК ВИЧ-1 обнаружена
отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> или отсутствует	–	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК. В случае повторения аналогичного результата рекомендуется повторное взятие исследуемого материала.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции, обратной транскрипции и амплификации кДНК/ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		
		FAM	JOE	ROX
При исследовании цельной крови				
ПК	Экстракция РНК/ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК/ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
При исследовании плазмы крови, сыворотки крови				
ПК	Экстракция РНК/ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–
ОК	Экстракция РНК/ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	–
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует	–

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM, JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК, для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению

- и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружены РНК/ДНК ВИЧ-1, начиная с этапа экстракции РНК/ДНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК/ДНК ВИЧ-1.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-LA при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA без разукomплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

Форма 1. Реагент «Гемолитик» и комплект реагентов «РИБО-преп» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С, кроме ВКО-FL и ОКО. ВКО-FL и ОКО хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Реагент «Гемолитик» и комплект реагентов «РИБО-преп» хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь РНК/ДНК-ВИЧ-Луо хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (ВКОЛ, ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

Форма 3. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-LA хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL РНК/ДНК ВИЧ и

ПЦР-буфера-В. ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ и ПЦР-буфер-В хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ хранить в защищенном от света месте. Лиофилизированные реагенты (Смесь ОТ-ПЦР-ферментов, контрольные образцы ВКОЛ, ПКОО РНК/ДНК ВИЧ) хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем. Восстановленные реагенты ВКОЛ, ПКОО РНК/ДНК ВИЧ хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев. Восстановленный реагент Смесь ОТ-ПЦР-ферментов хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 3 месяцев.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹⁰.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского

К.Э. Соболев



¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Дата изготовления		Предел температуры
	Изготовитель		Беречь от влаги
	Осторожно!		

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» из образцов цельной крови

ВНИМАНИЕ! В экстракцию берется осадок лейкоцитов, полученный после подготовки исследуемого материала (цельная кровь).

ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного комплекта реагентов имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Подготовка к процедуре экстракции РНК/ДНК.

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Прогреть **раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Процедура экстракции РНК/ДНК

1. В каждую пробирку с осадком, полученным после подготовки исследуемого материала, внести:
 - **10 мкл ВКО-FL (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT, форма 1);**
 - **10 мкл восстановленного ВКОЛ (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, форма 2),** используя для каждой пробы и реагента отдельный наконечник с фильтром. Промаркировать пробирки.
2. Промаркировать одну дополнительную пробирку для положительного контроля (ПК) с ВКО-FL (или ВКОЛ) и внести:
 - **100 мкл ПКО РНК/ДНК ВИЧ (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT, форма 1);**
 - **100 мкл восстановленного ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, форма 2).**
3. Промаркировать одну дополнительную пробирку для отрицательного контроля (ОК) с ВКО-FL (или ВКОЛ) и внести **100 мкл ОКО.**
4. Внести в каждую пробирку с исследуемыми образцами и контролями экстракции по **300 мкл раствора для лизиса,**

- используя для каждой пробирки отдельный наконечник с фильтром.
5. Закрывать крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости на вортексе.
 6. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
 7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе (не менее 10 секунд для каждой пробирки).
 8. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 12 тыс g** (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
 9. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 10. 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.
 11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1-2 мин при 12 тыс g** на микроцентрифуге.
 12. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 13. Аналогично провести одну отмывку, используя **200 мкл раствора для отмывки 4**.
 14. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка.
 15. Добавить в пробирки **РНК-буфер**:
 - **50 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT, форма 1),**
 - **70 мкл (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, форма 2).**
 16. Закрывать пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически перемешивая на вортексе.

17. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК/ДНК. Пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР/ПЦР.

Очищенные РНК/ДНК-пробы можно хранить в течение суток при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» из 100 мкл образцов плазмы/сыворотки крови

ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного комплекта реагентов имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Подготовка к процедуре экстракции РНК

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Прогреть **раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Процедура экстракции РНК

1. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции), промаркировать.
2. В каждую пробирку внести:
 - **10 мкл ВКО-FL** (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT, форма 1);
 - **10 мкл** восстановленного **ВКОЛ** (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L, форма 2).
3. В пробирки с **ВКО-FL** (или **ВКОЛ**) внести по **100 мкл** исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
4. В пробирку положительного контроля (ПК) с **ВКОЛ** внести **100 мкл** восстановленного **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ**.
5. В пробирку отрицательного контроля (ОК) с **ВКО-FL** (или **ВКОЛ**) внести **100 мкл** **ОКО**.
6. В каждую пробирку с исследуемыми образцами и контролями экстракции внести по **300 мкл** **раствора для лизиса**.
7. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости на вортексе.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин** при **65 °С** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
9. Добавить в пробирки по **400 мкл** **раствора для**

- преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
10. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **12 тыс g** (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
 11. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 12. 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.
 13. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге **в течение 1-2 мин** при **12 тыс g** на микроцентрифуге.
 14. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 15. Аналогично провести одну отмывку, используя **200 мкл раствора для отмывки 4**.
 16. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка.
 17. Добавить в пробирки **РНК-буфер**:
 - **50 мкл** (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант **FRT, форма 1**),
 - **70 мкл** (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант **FRT-L, форма 2**).
 18. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65°С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
 19. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

Очищенные РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение

препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» из 1000 мкл образцов плазмы/сыворотки крови

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Подготовка к процедуре экстракции РНК

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.

Процедура экстракции РНК

1. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать.
2. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл восстановленный реагент ВКОЛ, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл восстановленного реагента ВКОЛ, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики.** При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

Таблица 9

Количество образцов для экстракции РНК/ДНК	Восстановленный реагент ВКОЛ, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

3. Внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси **восстановленного реагента ВКОЛ, компонента А и магнетизированной силики.**
4. Добавить в каждую пробирку **1000 мкл** исследуемого образца, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
5. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **1000 мкл ОКО.**
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК)

- внести **1000 мкл** восстановленного **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ**.
7. Внести в пробирки по **2,6 мл** лизирующего раствора **МАГНО-сорб**.
 8. Перемешать пипетированием, закрыть крышки.
 9. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С на 10 мин**. Кратким центрифугированием осадить капли.
 10. Перенести пробирки в обычный штатив, открыть крышки.
 11. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**.
 12. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 1000 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
 13. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
 14. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции), промаркировать их.
 15. Ресуспендировать магнетизированную силику со стенок осторожным перемешиванием на вортексе, а затем пипетированием. Перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
 16. Переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
 17. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
 18. Добавить в пробирки **700 мкл раствора для отмывки 5**, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе. Осадить капли кратким центрифугированием и повторить п. 16-17.
 19. Аналогично провести одну отмывку, используя **700 мкл раствора для отмывки 6**.
 20. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**,

плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе. Осадить капли кратким центрифугированием.

21. Переставить пробирки с открытыми крышками в магнитный штатив на **1 мин**, затем осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.
22. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе на **10 мин**.
23. Добавить в пробирки **50 мкл буфера для элюции**.
24. Перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
25. Осадить капли кратким центрифугированием и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.

РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку. Допускается хранение при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Экстракция РНК из 1000 мкл с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»¹¹ (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария)). Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматических станций и с использованием соответствующего протокола экстракции.

ВНИМАНИЕ! Порядок подготовки и использования

¹¹ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

контрольных образцов описан в разделе «Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов».

Объем исследуемых и контрольных образцов экстракции, загружаемых на борт автоматической станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 1100 мкл.

Объем ВКО на один образец – 10 мкл.

Рекомендуемый объем элюции – 75 мкл. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Экстракция РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» из 200 мкл образцов цельной крови, плазмы/сыворотки крови

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Подготовка к процедуре экстракции РНК/ДНК

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки **5** прогреть при температуре 60°C до полного растворения кристаллов.

Процедура экстракции РНК/ДНК

1. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительные контроли экстракции) и промаркировать их.
2. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл восстановленный реагент ВКОЛ, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл восстановленного реагента ВКОЛ, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

Таблица 10

Количество образцов для экстракции РНК/ДНК	Восстановленный реагент ВКОЛ, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380

3. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси **восстановленного реагента ВКОЛ, компонента А и магнетизированной силики**.
4. Добавить в каждую пробирку **200 мкл** исследуемого образца, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Перемешать пипетированием и закрыть крышкой.

5. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **200 мкл** восстановленного **ПКОЛ РНК/ДНК ВИЧ**.
7. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
8. Перемешать пипетированием, закрыть крышки.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С на 10 мин**.
10. Осадить капли кратким центрифугированием, открыть крышки и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
11. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, плотно закрыть крышки.
13. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, а затем осадить капли кратким центрифугированием. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки.
14. Перенести пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
15. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п.11. Перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (п. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку, используя **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**, плотно закрыть крышки. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, затем осадить капли кратким центрифугированием. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость аналогично п.11.
20. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение

10 мин.

21. Добавить в пробирки **50 мкл буфера для элюции**.

22. Перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.

23. Осадить капли кратким центрифугированием и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.

ВНИМАНИЕ! При экстракции из цельной крови перенести надосадочную жидкость в чистые промаркированные пробирки, осадить капли кратким центрифугированием и повторно переставить пробирки в магнитный штатив на 2 мин.

24. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК/ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК/ДНК для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.

РНК/ДНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку. Допускается хранение при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Экстракция РНК 200 мкл с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»¹² (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария)). Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматических станций и с использованием соответствующего протокола экстракции.

ВНИМАНИЕ! Порядок подготовки и использования контрольных образцов описан в разделе «Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов».

Объем исследуемых и контрольных образцов экстракции,

¹² Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. МАГНО-сорб. 200 мкл цельной крови,
плазмы/сыворотки крови

загружаемых на борт автоматической станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 250 мкл.

Объем ВКО на один образец – 10 мкл.

Рекомендуемый объем элюции – 75 мкл. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Схема приготовления реакционных смесей при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT

			Объем реагентов на указанное количество реакций			
Объем реагента на одну реакцию, мкл			15,00	10,00	1,00	0,50
Количество исследуемых образцов	Количество экстрагируемых образцов ¹³	Количество реакций ¹⁴	ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
1	3	4	60	40	4	2
2	4	5	75	50	5	2,5
3	5	6	90	60	6	3
4	6	7	105	70	7	3,5
5	7	8	120	80	8	4
6	8	9	135	90	9	4,5
7	9	10	150	100	10	5
8	10	11	165	110	11	5,5
9	11	12	180	120	12	6
10	12	13	195	130	13	6,5
11	13	14	210	140	14	7
12	14	15	225	150	15	7,5
13	15	16	240	160	16	8
14	16	17	255	170	17	8,5
15	17	18	270	180	18	9
16	18	19	285	190	19	9,5
17	19	20	300	200	20	10
18	20	21	315	210	21	10,5
19-22	21-24	22-24	Объединить содержимое пробирок			

¹³ Количество экстрагируемых образцов = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК, ПК).

¹⁴ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК, ПК) + запас на один образец.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Схема приготовления реакционных смесей при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-LA

			Объем реагентов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию, мкл			15.00	10.00	2.00
Количество исследуемых образцов	Количество экстрагируемых образцов ¹⁵	Количество реакций ¹⁶	ПЦР-смесь-FL РНК/ДНК ВИЧ	ПЦР-буфер-В	Восстановленная Смесь ОТ-ПЦР-ферментов
1	3	4	60	40	8
2	4	5	75	50	10
3	5	6	90	60	12
4	6	7	105	70	14
5	7	8	120	80	16
6	8	9	135	90	18
7	9	10	150	100	20
8	10	11	165	110	22
9	11	12	180	120	24
10	12	13	195	130	26
11	13	14	210	140	28
12	14	15	225	150	30
13	15	16	240	160	32
14	16	17	255	170	34
15	17	18	270	180	36
16	18	19	285	190	38
17	19	20	300	200	40
18	20	21	315	210	42
19-22	21-24	22-24	Объединить содержимое пробирок		

¹⁵ Количество экстрагируемых образцов = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК, ПК).

¹⁶ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК, ПК) + запас на один образец.