

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И. Покровский
« 23 » _____ 2009 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»

« УТВЕРЖДАЮ »

Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« _____ » _____ 20 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

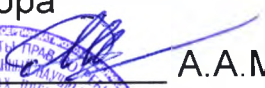
по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита А (HAV)
в клиническом материале и объектах окружающей среды
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HAV-FL»

«СОГЛАСОВАНО»

И.О.директора ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора


А.А.Мовсисянц

« 23 » 12 2009 г.



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	12
ВАРИАНТ FER	14
СОСТАВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	17
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	18
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	18
Б. Проведение амплификации	20
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ».....	20
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	21
Интерпретация результатов в исследуемых образцах	21
Интерпретация результатов в контрольных образцах	22
ВАРИАНТ FRT	23
СОСТАВ.....	24
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	27
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	28
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	28
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	29
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	30
Интерпретация результатов в исследуемых образцах	30
Интерпретация результатов в контрольных образцах	31
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	33
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Выделение РНК из образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»	33
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Выделение РНК из образцов при использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб»	36
Б1. Выделение из 1000 мкл исследуемого образца.....	36
Б2. выделение из 200 мкл исследуемого образца	38
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Схема приготовления реакционных смесей для варианта FER... 40	
В1. Приготовление реакционной смеси в случае необходимости подготовки пробирок «ФОН»	40
В2. Приготовление реакционной смеси при повторном использовании пробирок «фон».....	41
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Схема приготовления реакционных смесей для варианта FRT	42

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное 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.). Для выделения РНК используются наборы реагентов, производимые или рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК HAV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: 1) экстракцию (выделение) РНК из исследуемого материала, 2) обратную транскрипцию РНК и ПЦР-амплификацию кДНК/ДНК и 3) гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция РНК из 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/ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-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 варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта 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/ДНК HAV. Положительный контрольный образец этапа выделения ПКО HAV-FL-рес 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).

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 вариантах

Вариант FEP

Набор реагентов выпускается в 6 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.

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая выделение РНК из клинического материала и объектов

Handwritten signature

окружающей среды, проведение реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) РНК/ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 6 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.

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

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) РНК/ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вариант	Объём выделения, мкл	Метод выделения	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность
Вариант FEP/ Вариант FRT	100	«РИБО-преп»	Плазма (сыворотка) крови; Осветленные экстракты фекалий; Концентраты (элюаты) проб воды	500 коп/мл
	100	«NucliSENS easyMAG»	Плазма (сыворотка) крови; Концентраты (элюаты) проб воды	500 коп/мл
	200	«МАГНО-сорб»	Плазма (сыворотка) крови; Концентраты (элюаты) проб воды	250 коп/мл
	1000	«МАГНО-сорб»	Плазма (сыворотка) крови; Концентраты (элюаты) проб воды	50 коп/мл

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, 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 (Coxsackie 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.

акт

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», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – 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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Лист по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступен по запросу.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с директивой Европейского Союза 67/548/ЕЕС следующие реагенты подлежат маркировке, как содержащие опасные вещества, а

7/11/20

также требуют указания факторов риска (R) и мер предосторожности (S):

Наименование реагента	Наименование комплекта, в который входит реагент	Наименование опасного (в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС) вещества	Код опасности, перечень факторов риска (R) и мер предосторожности (S) в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС	ПДК ¹ макс
				разовая/среднесменная (мг/м ³),
				основная опасность ¹
				класс опасности ¹
Раствор для лизиса	«РИБО-преп»	Гуанидин тиоционат	Harmful ² R:20/21/22-32-52/53 S:13-61	Нет данных
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	«МАГНО-сорб»			
Раствор для отмывки 5	«МАГНО-сорб»			
Раствор для преципитации	«РИБО-преп»	Изопропанол	Highly Flammable. Irritant R:11-36-67 S:7-16-24/25-26	50/10
				Пары
				Класс опасности 3
				не требуется
Раствор для отмывки 3	«РИБО-преп»	Этанол	Highly Flammable R:11 S:7-16	2000/1000
раствор для отмывки 4	«РИБО-преп»			Пары
Раствор для отмывки 5	«МАГНО-сорб»			Класс опасности 4
Раствор для отмывки 6	«МАГНО-сорб»			не требуется

Расшифровка обозначений факторов риска (R) и мер предосторожности (S).

R11: легко воспламеняется.

R20/21/23: опасен при проглатывании, контакте с кожей или вдыхании.

R22: опасен при проглатывании.

R32: при контакте с кислотой образуются токсический газ.

R36: раздражает слизистую глаз.

R52/53: опасен для водных организмов, может вызывать долговременное нежелательное воздействие на водную среду.

R67: пары вещества могут вызывать сонливость и головокружение.

S7: держать емкость плотно закрытой.

S13: держать вдали от пищевых продуктов и напитков, продуктов для животных.

S16: держать вдали от источников огня, не курить.

S24/25: избегать контакта с кожей и глазами.

¹ Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Классы опасности по ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

² Использованы данные о коде опасности, факторах риска (R) и мерах предосторожности (S) фирмы «Sigma-Aldrich».

8
ириб

S26: в случае попадания в глаза, немедленно промыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.

S61: избегать попадания в окружающую среду.

ВНИМАНИЕ! При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Выделение 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 закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
6. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»:

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, «Ахуген», США).

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

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 заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки 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).

При использовании автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот:

1. Автоматическая станция для выделения 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 гибридационно-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 аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Axygen», США).
5. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок 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 и одноразовые перчатки.

8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

При использовании комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100-FEP F.
«ПЦР-комплект» вариант 50-FEP F:

9. Амплификатор, адаптированный для ПЦР-пробирок 0,5 мл, например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или амплификатор, адаптированный для ПЦР-пробирок 0,2 мл, например, «Gradient Palm Cyclер» («Corbett Research», Австралия), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems», США) «MAXYGENE» («Ахуген», США) или эквивалентные. Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), «Джин-2» (версия п.о. не ниже 4.4i) («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентный.

10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (плоская крышка, нестрипованные) на 0,2 или 0,5 мл:

а) объемом 0,2 мл (например, «Ахуген», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл («Gradient Palm Cyclер», «GeneAmp PCR System 2700», «MAXYGENE» и др.);

б) объемом 0,5 мл (например, «Ахуген», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

При использовании комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100-FRT F.
«ПЦР-комплект» вариант 50-FRT F:

11. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «iQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США) или эквивалентные.

12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).

б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»).

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 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 выделения 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 выделения 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 выделения РНК. 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.

ВАРИАНТ FER

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала включает:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ³	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. 2 комплекта входят в состав формы 1, 1 комплект – в состав формы 2.

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 ³	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ³	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб объемом 1000 мкл, включая контроли. 1 комплект входит в состав формы 3.

³ 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 ³	25	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ³	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	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. 1 комплект входит в состав формы 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-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 (MMiv)	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. 1 комплект входит в состав форм 1, 3, 4 и 5.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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 ПЦР-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 (MMiv)	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. 1 комплект входит в состав форм 2 и 6.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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 (выделение) 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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» Вариант FEP.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в ЗОНЕ-1 – помещении для обработки исследуемого материала).

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 выделения РНК – 0,1 мл; объем осветленного экстракта фекалий для выделения 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 выделения 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 выделения РНК – 0,2 мл. Порядок работы см. в Приложении Б пункт Б2.
- **автоматическая станция «NucliSENS® easyMAG™»**. Возможно использование протоколов, позволяющих проводить экстракцию (выделение) РНК из **100 мкл исследуемого образца (плазма (сыворотка) периферической крови, концентраты (элюаты) проб воды)**. Процедура выделения проводится в соответствии с инструкцией к автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™». Допускается использование режимов лизиса на борту прибора («On-board») и вне прибора («Off-board»). Обязательным условием является внесение ВКО в образцы до начала выделения в объёме 10 мкл на одну пробу. Программируемый объем элюции – 55 мкл, объем магнитной силики – 20 мкл. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР рекомендуется поставить в течение 30 мин после выделения 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

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем РНК-пробы - 10 мкл.

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

А. Подготовка пробирок для проведения 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 В). 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 выделения (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 В, пункт В1).

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 (MMIv)) 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 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, того же типа выделительных реагентов и того же типа ПЦР-пробирок.

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить из расчета на 1 пробу **0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)** (см. также приложение В, пункт В1). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv), указанное в расчетной таблице приложения В (пункт В1), 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 (MMIv)** (см. также приложение В, пункт В2). Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

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

8. Под масло или непосредственно на поверхность масла в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл РНК-пробы**, выделенной из клинических или контрольных образцов, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером 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 ПЦР-амплификации

кДНК HAV и детекции по каналу HEX и контроль ПЦР-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 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 ⁴				Для амплификаторов с матричным регулированием ⁵			
цикл	температура, °C	время	циклов	цикл	температура, °C	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» Вариант FEP ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

⁴ например, *«Терцик» («ДНК-Технология»), «GeneAmp PCR System 2400» («Perkin Elmer»);
^{**}«Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «MaxyGene» («AXYGEN Scientific»), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»)
⁵ например, «PTC-100» («MJ Research»), «Uno-2» («Biometra») и др.

20
Итого

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.

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 повторного выделения и тестирования
Ниже порогового значения	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Сомнительный	Проба требует повторного выделения и тестирования
Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Невалидный	Проба требует повторного выделения и тестирования

Интерпретация результатов в контрольных образцах

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

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	HEX	
ОК	Экстракция (выделение) ДНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	«-» или «ОК»
ПК	Экстракция (выделение) ДНК	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!

- 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 выделения РНК из исследуемого материала.
- 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 выделения (экстракции) РНК.

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁶	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. 2 комплекта входят в состав формы 1, 1 комплект – в состав формы 2.

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 ⁶	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ⁶	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. 1 комплект входит в состав формы 3.

⁶ 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 ⁶	25	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ⁶	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. 1 комплект входит в состав формы 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-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 (MMIv)	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. 1 комплект входит в состав форм 1, 3, 4 и 5.

25
[Handwritten signature]

ВАРИАНТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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 ПЦР-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 (MMIv)	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. 1 комплект входит в состав форм 2 и 6.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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 (выделение) 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 ФГУН ЦНИИЗ Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» Вариант FRT.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в ЗОНЕ-1 – помещении для обработки исследуемого материала).

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 выделения РНК – 0,1 мл; объем осветленного экстракта фекалий для выделения 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 выделения 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 выделения РНК – 0,2 мл. Порядок работы см. в Приложении Б пункт Б2.
- **автоматическая станция «NucliSENS® easyMAG™»**. Возможно использование протоколов, позволяющих проводить экстракцию (выделение) РНК из **100 мкл исследуемого образца (плазма (сыворотка) периферической крови, концентраты (элюаты) проб воды)**. Процедура выделения проводится в соответствии с инструкцией к автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™». Допускается использование режимов лизиса на борту прибора («On-board») и вне прибора («Off-board»). Обязательным условием является внесение ВКО в образцы до начала выделения в объеме 10 мкл на одну пробу. Программируемый объем элюции – 55 мкл, объем магнитной силики – 20 мкл. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР рекомендуется поставить в течение 30 мин после выделения 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»

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем РНК-пробы - 10 мкл.

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

А. Подготовка пробирок для проведения 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 (MMiv)** (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 аэрозольным барьером для каждой пробы, добавить по **10 мкл РНК**, выделенной 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-амплификации кДНК HAV и детекции по каналу JOE/Yellow/HEX и контроль ПЦР-амплификации 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-2» для приборов роторного типа⁷

Этап	Температура, °С	Продолжительность Этапа	Измерение флуоресценции	Количество 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-2» для приборов планшетного типа⁸

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество 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

⁷ Например, RotorGene 3000 и RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)

⁸ Например, iQiCycler, iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)

сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу **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 выделения 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 реальном времени и методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» Вариант 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 выделения 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	Выделение РНК	не определено	$\leq B1$
ПК	Выделение РНК	$\leq K1$	$\leq B1$
К-	ПЦР	не определено	не определено
К+/BK+	ПЦР	$\leq K2$	$\leq B2$

K1, K2, B1 и B2 - 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 выделения РНК из исследуемого материала.
2. Если для положительного контроля ПЦР (К+/BK+) 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 выделения (экстракции) РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT HAV, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMIv). RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT HAV, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний



Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Выделение 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 выделения). 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 выделении 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) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения 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 °C 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 °C 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 (РНК-проба). Указанный материал готов к постановке обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР.

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

Б1. Выделение из 1000 мкл исследуемого образца

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60°C до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли выделения) и промаркировать их.
3. При выделении РНК из 24 образцов:
 - а) во флакон с **лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл)** внести 0,28 мл **ВКО STI-248-гес (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. При выделении РНК менее чем из 24 образцов:
 - а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО STI-248-гес, компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-248-гес, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для выделения РНК	ВКО STI-248-гес, 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-гес, 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-гес 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 отдельные 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 выделения) и промаркировать их.
 13. Ресуспендировать магнетизированную силику со стенок осторожным вортиксованием, 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 очищенных ДНК/РНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива.**

После отбора надосадочной жидкости в пробирки ДНК-пробы можно хранить в

течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С; РНК-пробы 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. выделение 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 выделения) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО STI-248-рес, компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО STI-248-рес, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для выделения РНК	ВКО STI-248-рес, 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-рес, 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-рес 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 вортиксированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.

14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.

15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.

16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 12-15).

17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.

18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.

19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.

20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.

21. Добавить **50 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.

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

23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

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

РНК/ДНК-пробы не рекомендуется хранить дольше **30 мин** при температуре от **2 до 8 °C**.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Схема приготовления реакционных смесей для варианта FEP

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

Общий объем реакции - 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию - 15 мкл Объем РНК-пробы - 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 (MMIv)***
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 выделения РНК - 2K (OK и ПК).

** N+2K+2K_{ПЦР}+2Ф - включает количество исследуемых образцов (N), два контроля этапа выделения РНК (2K), два контроля этапа ОТ-ПЦР - 2K_{ПЦР} (K+/BK+) и две пробирки «Фон» (2Ф).

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

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

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 ПЦР-пробирок.

Общий объем реакции - 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию - 15 мкл Объем РНК-пробы - 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 (MMiv)
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 выделения РНК - **2K** (ОК и ПК).
- ** **N+2K+2K_{пцр}** - включает количество исследуемых образцов (**N**), два контроля этапа выделения РНК (**2K**) и два контроля этапа ОТ-ПЦР - **2K_{пцр}** (К+/ВК+).

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Схема приготовления реакционных смесей для варианта FRT

Общий объем реакции - 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию - 15 мкл Объем РНК-пробы - 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 (MMiv)
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 выделения РНК - **2K** (ОК и ПК).
- ** **N+2K+2K_{пцр}** - включает количество исследуемых образцов (**N**), два контроля этапа выделения РНК (**2K**) и два контроля этапа ОТ-ПЦР - **2K_{пцр}** (K+/BK+).