

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ

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

В.И.Покровский
«14» декабря 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения РНК

вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1)

в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-М-FL»

АмплиСенс®

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ОЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ПРАВИЛА ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	10
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	13
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- сорб»	18
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО- сорб» совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК с использованием автоматической станции NucliSENS easyMAG	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	27

ПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

Верхний ПКО ВИЧ	- Высококонцентрированный положительный контрольный образец экстракции
ВКО STI-AB-гес	- Внутренний контрольный образец
ВИЧ	- Вирус иммунодефицита человека
Нижний ПКО ВИЧ	- Низкоконцентрированный положительный контрольный образец экстракции
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПКО	- Положительный контрольный образец
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
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-М-FL» предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из плазмы крови. Используемые в наборе реагентов специфические праймеры и зонды гибридируются в области региона *pol* генома вируса иммунодефицита человека. Набор реагентов эффективно выявляет и количественно измеряет варианты ВИЧ-1, относящиеся к группе М (субтипы А, В, С, D, F, G, Н и рекомбинанты АВ, АЕ), группе N и группе О. Стандартное отклонение измеренной величины вирусной нагрузки (в логарифмах копий в мл) составляет не более 0,3 lg на всем диапазоне измерения.

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Количественное определение РНК ВИЧ-1 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию РНК из образцов клинического материала и обратную транскрипцию с амплификацией участка РНК ВИЧ-1 и гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция РНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-AB-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции, совмещенная с реакцией амплификации участка гДНК ВИЧ-1 при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси 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 осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы.

Количественное определение РНК ВИЧ-1 методом ПЦР в режиме «реального времени» основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией РНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). По результатам амплификации РНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации РНК-мишени в исследуемых образцах.

РНК-калибраторы входят в состав «Комплекта для калибровки и необходимы в случаях, если:

- а) используется новая серия комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;
- б) используется новая серия комплекта реагентов для экстракции РНК;
- в) изменился объем исследуемых образцов.

После того, как калибровка успешно проведена, она может быть использована в

ление 6 мес.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект расходных материалов, комплекты реагентов «МАГНО-рб» вариант 100-1000, «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 2 включает комплект расходных материалов, комплекты реагентов для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG вариант 20 (bioMérieux, Франция), «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 3 включает комплект реагентов «Комплект для калибровки».

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

ВНИМАНИЕ! При использовании новой серии комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, новой серии комплекта реагентов для экстракции РНК или в случае изменения объема исследуемых образцов необходимо предварительное проведение калибровки с помощью «Комплекта для калибровки».

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения калибровки системы (серия набора реагентов и прибор для амплификации). Для проведения полного анализа необходимо дополнительно использовать форму комплектации 1 или 2 данного набора реагентов (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность и линейный диапазон измерения

Объём экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Линейный диапазон, копий РНК ВИЧ/мл, (lg[копий/мл])	Аналитическая чувствительность, копий РНК ВИЧ/мл, (lg[копий/мл])
1000	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	40 – 10 ⁷ (1,60 – 7,00)	20 (1,30)
200	«МАГНО-сорб» NucliSENS easyMAG	150 – 10 ⁷ (2,18 – 7,00)	150 (2,18)

Аналитическая специфичность

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

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по

запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ПОДРОБНОСТИ 1. Экстракция РНК из клинического материала:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», BioSan, Латвия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема с возможностью дозирования от 10 до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
4. Штативы для пробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Ахуген, США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Ахуген, США).
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

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

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм, от 25 до 100 °С (например, Bioer Technology, Китай).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия).
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл (например, Promega, США).
4. Магнитный штатив для пробирок объемом 5 мл, диаметром 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 закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, США).
7. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом 5 мл, диаметром 12 мм, круглодонные (например, Ахуген, США).
8. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм (например, Ахуген, США).
9. Электронный или механический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл (например, «Ленпипет», Россия)

1. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл (например, Ахуген, США) и до 5000 мкл (например, Thermo scientific, Финляндия).

При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG:

1. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК 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 магнитная силика) (bioMérieux, Франция)).
3. Многоканальный дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 50 до 300 мкл (например, «Ленпипет», Россия)

ЗОНА 2. Проведение реакций обратной транскрипции и амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Автоматические дозаторы переменного объема (от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
2. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и 1000 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
5. Холодильник от 2 до 8 °С.
6. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
7. Емкость для сброса наконечников.

При использовании амплификатора Abbott m2000rt (Abbott, США):

1. Амплификатор Abbott m2000rt (Abbott, США).
2. Оптические 96-луночные реакционные планшеты (например, Ахуген, США).
3. Оптические липкие крышки (например, Ахуген, США).
4. Аппликаторы для крышек (например, Ахуген, США).

При использовании прибора для ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q:

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) или Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).
2. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

Тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия)

Программное обеспечение FRT Manager (производитель «ИнтерЛабСервис», Россия).

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.

Материалом для исследования служит свежая цельная кровь, взятая в одноразовую пробирку с 3 % раствором ЭДТА в соотношении 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА). После взятия пробирку с кровью закрыть крышкой, перемешать переверачиванием 3 – 4 раза и хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. После центрифугирования крови при 800-1600 об/мин в течение 20 мин отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Хранить плазму можно не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ²	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ²	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6	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 экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов для автоматической станции выделения нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG вариант 120 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Буфер для лизиса (NucliSens easyMAG Lysis Buffer)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 флакон
Буфер для экстракции 1 (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 1)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 флакон
Буфер для экстракции 2 (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 2)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 флакон
Буфер для экстракции 3 (NucliSens easyMAG Extraction Buffer 3)	Прозрачная бесцветная жидкость	1000	1 флакон
Магнитная силика (NucliSens easyMAG Magnetic Silica)	Суспензия черного цвета	0,6	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 120 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) с гибридизационно-флуоресцентной

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

етекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОТ-ПЦР-смесь-А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,14	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

< комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
Нижний ПКО ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
Верхний ПКО ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ВКО STI-AB-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки

Комплект реагентов «Комплект для калибровки» – комплект реагентов для проведения калибровки системы – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Калибратор А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок
Калибратор В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение четырех калибровок при постановке трех повторов каждого калибратора, либо трех калибровок при постановке четырех повторов каждого калибратора. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект расходных материалов – комплект для проведения реакции амплификации в приборе Abbott m2000rt – **включает:**

Расходный материал	Кол-во
Оптический 96-луночный реакционный планшет	4 шт.
Оптическая липкая крышка	4 шт.

Комплект рассчитан на проведение 384 реакций амплификации. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

Экстракция РНК из исследуемых образцов.

Обратная транскрипция РНК и амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов:

«МАГНО-сорб» в соответствии с приложением 1 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»» и приложением 2 «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» совместно с автоматическими станциями для экстракции».

- комплект реагентов для автоматической станции **NucliSENS easyMAG** в соответствии с приложением 3 «Экстракция РНК с использованием автоматической станции NucliSENS easyMAG».

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

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения амплификации).

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

Общий объем реакции – 100 мкл, объем пробы РНК – 50 мкл.

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

При использовании амплификатора Abbott m2000rt (Abbott, США)

1. Включить и запустить амплификатор Abbott m2000rt.

ВНИМАНИЕ! Амплификатор должен прогреться в течение 15 мин.

2. Создать файл постановки реакции в соответствии с инструкцией к амплификатору. Выбрать вариант анализа, соответствующий объему тестируемого образца.

Внести в файл постановки реакции значения серий калибраторов (в том случае, если необходимо провести калибровку системы) и контролей. Значения серий

указаны во вкладышах, прилагающихся к «Комплекту для калибровки» и контрольным образцам.

- Приготовить реакционную смесь. Для этого достать и разморозить по одной пробирке каждого реагента **«ПЦР-комплект» вариант FRT**. Затем в пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-С** добавить 949 мкл **ОТ-ПЦР-смеси-А** и 271 мкл **ОТ-ПЦР-смеси-В**. Тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки. Приготовленная смесь должна быть использована в течение 1 ч после приготовления.

ВНИМАНИЕ! Приготовленной смеси достаточно для проведения 24 реакций.

- Внести по 50 мкл реакционной смеси в ячейки 96-луночного реакционного планшета. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
- Используя отдельные наконечники с фильтром для каждого образца, добавить по 50 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых, контрольных образцов или калибраторов, в ячейки 96-луночного реакционного планшета. Содержимое пробирок осторожно перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК необходимо избегать попадания магнитного сорбента в реакционную смесь.

- Заклеить 96-луночный реакционный планшет оптической липкой пленкой.
- Поместить реакционный планшет в амплификатор Abbott *m2000rt*.
- Запустить протокол анализа в соответствии с инструкцией по использованию амплификатора Abbott *m2000rt*.
- По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

При использовании амплификаторов Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q

- Включить амплификатор Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q.
- Запустить программное обеспечение FRT Manager.
- В закладке **Быстрый запуск** нажать кнопку **Новая постановка**.
- В раскрывающемся списке указать модель прибора Rotor-Gene 6000.
- Во вкладке **Реакционный блок** выбрать необходимый тип реакционного блока.
- Во вкладке **Группа совместимости** выбрать группу «ВИЧ-Монитор-М-FL».
- В открывшемся окне необходимо выбрать методику, разместить образцы в реакционном блоке и указать используемую серию набора реагентов (пп. 8-10).
- В окне **Методики** выбрать методику с соответствующим объемом клинических образцов (0,2 мл или 1 мл).
- В окне **Размещение** необходимо разместить исследуемые образцы и контроли в постановке:

При проведении постановки, совмещенной с калибровкой системы:

- калибраторы А и В не менее трех повторов, например, «Калибратор А1», «Калибратор А2» и т.д. При постановке калибраторов более чем в трех повторах необходимо повторно выбрать название одного из соответствующих калибраторов и разместить его в свободной ячейке.
- контроли этапа экстракции ОКО, Верхний ПКОВИЧ (HiPos) и Нижний ПКОВИЧ (LoPos).
- клинические образцы: создать новые образцы или выбрать из списка образцов, ожидающих проведения исследования.

При проведении постановки без калибровки системы (при наличии калибровочной постановки, используемой для расчета результатов):

- контроли этапа экстракции – ОКО, Верхний ПКОВИЧ (HiPos) и Нижний ПКОВИЧ (LoPos).
- клинические образцы: создать новые образцы или выбрать из списка образцов, ожидающих проведения исследования.

ВНИМАНИЕ! При отсутствии калибровки системы расчет результатов невозможен.

При получении неудовлетворительных результатов калибровки возможно проведение повторной калибровки, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот.

10. В окне **Серия реагентов**, в выпадающем списке выбрать используемую серию набора реагентов или зарегистрировать новую серию реагентов.

11. Приготовить реакционную смесь. Для этого достать и разморозить по одной пробирке каждого реагента из «ПЦР-комплект» вариант FRT. Затем в пробирку с ОТ-ПЦР-смесью-С добавить 949 мкл ОТ-ПЦР-смеси-А и 271 мкл ОТ-ПЦР-смеси-В. Тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки. Приготовленная смесь должна быть использована в течение 1 ч после приготовления.

ВНИМАНИЕ! Приготовленной смеси достаточно для проведения 24 реакций.

12. Внести в пробирки по 50 мкл готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

13. Используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца, в пробирки с реакционной смесью внести по 50 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых, контрольных образцов или калибраторов. Содержимое пробирок осторожно перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК необходимо избегать попадания магнитного сорбента в реакционную смесь.

ФОРМАТ FRT

4. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
5. Запустить выполнение программы, нажав кнопку **Запустить**.
6. По окончании выполнения программы амплификации приступить к учету результатов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов (в том случае, если необходимо провести калибровку системы) и контролей указываются во вкладышах, прилагающихся к «Комплекту для калибровки» и контрольным образцам.

17. Для этого зайти во вкладку **Завершенные постановки** для учета результатов постановки. Открыть постановку. Форма открывается на закладке с результатами по всей постановке. Для просмотра информации о результатах открыть вкладку «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-М-FL». Открыть вкладки **Green** и **Yellow**, просмотреть кривые флуоресценции и убедиться в отсутствии артефактов.
18. Если в данной постановке проводилась калибровка, то при условии получения постановки с зеленым флагом, возможно ее использование в качестве калибровочной. Для выбора постановки в качестве калибровочной необходимо во вкладке «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-М-FL» поставить «галочку» **Серия Пригодна для использования данных по калибраторам**.
19. Для подтверждения результатов (авторизации) всей постановки нажать **Авторизовать постановку** во вкладке **Вся постановка** или нажать **Авторизовать методику** во вкладке «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-М-FL». Для авторизации результатов отдельных образцов нажать **Авторизовать текущий**. Для подтверждения авторизации нажать **Подтвердить**.
20. Для распечатки бланка результатов открыть **Список результатов**, выбрать необходимые образцы или постановки и нажать **Печать бланка**.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрация РНК ВИЧ-1 в исследуемом образце или контроле рассчитывается с помощью сохраненной калибровочной кривой.

Программное обеспечение амплификатора Abbott m2000rt автоматически рассчитывает и представляет результаты либо в виде копий/мл или lg (копий/мл); либо в виде международных единиц на мл (IU/ml) или lg (IU/ml).

При использовании приборов для проведения ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene 6000 или Rotor-Gene Q автоматически рассчитывает и представляет результаты программное обеспечение FRT manager.

Более подробная информация о работе с указанным программным обеспечением изложена в инструкциях по применению соответствующего ПО.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

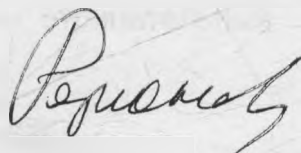
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект расходных материалов хранить при температуре от 15 до 25 °С. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов для автоматической станции экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT и «Комплект для калибровки» хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Л. Никонов

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

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

Объем исследуемого материала для экстракции РНК – 1 мл или 0,2 мл.

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

Разморозить контрольные образцы, ВКО STI-AB-rec и калибраторы (в случае необходимости процедуры калибровки). Перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! После размораживания контрольные образцы и калибраторы необходимо использовать в течение 24 ч. Повторное замораживание/оттаивание не допускается!

Порядок работы.

Экстракция РНК из 1 мл образца

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительные контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции РНК из 24 образцов:
 - а) во флакон с лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл) внести все содержимое пробирки с ВКО STI-AB-rec (0,3 мл) (ВКО), 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 объемом 5 мл по 2,6 мл подготовленной смеси лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО, компонента А и магнетизированной силики.
4. При экстракции РНК менее чем из 24 образцов:
 - а) смешать в отдельной стерильной пробирке объемом 1,5 мл ВКО STI-AB-rec (ВКО), компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

10 мкл ВКО, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

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

- б) внести в пробирки объемом 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО, компонента А и магнетизированной силики.
- в) внести в пробирки объемом 5 мл по **2,6 мл лизирующего раствора МАГНО-сорб.**
5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл исследуемого образца плазмы** и перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. Для каждой панели необходимо поставить **верхний положительный контроль** и **нижний положительный контроль**. Для этого в промаркированную пробирку с лизирующим раствором добавить по **1 мл** соответствующего контрольного образца (**верхний ПКОВИЧ** или **нижний ПКОВИЧ**), перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **1 мл ОКОВИЧ**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.

ВНИМАНИЕ! В случае необходимости проведения калибровки требуется провести экстракцию двух калибровочных образцов (калибратор А и калибратор В) не менее чем в трех повторах каждый. Процедура экстракции калибраторов аналогична процедуре экстракции исследуемых образцов.

8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин.**
10. Отобрать надосадочную жидкость, используя наконечники без фильтра на 1000 мкл. 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 объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительные контроли экстракции) и промаркировать их.
13. Смыть магнетизированную силику со стенок осторожным вортексированием, а

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.

ВНИМАНИЕ! Допускается оставлять на стенках пробирок объемом 5 мл незначительное количество магнитной силики.

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 вортиксованием, 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 **100 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. Для отбора надосадочной жидкости без примеси магнетизированной силики необходимо повернуть пробирки на 360° вокруг своей оси, не снимая их с магнитного штатива. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая магнетизированную силику.**

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

Экстракция РНК из 200 мкл образца

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 объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительные контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке объемом 1,5 мл **ВКО STI-AB-rec**

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО, 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, 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 **верхний положительный контроль** и **нижний положительный контроль**. Для этого в промаркированную пробирку с лизирующим раствором добавить по **200 мкл** соответствующего контрольного образца (**верхний ПКОВИЧ** или **нижний ПКОВИЧ**) и перемешать на вортексе.
- 8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в промаркированную пробирку с лизирующим раствором добавить **200 мкл ОКО** и перемешать на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае необходимости проведения калибровки требуется провести экстракцию двух калибровочных образцов (калибратор А и калибратор В) не менее чем в трех повторах каждый. Процедура экстракции калибраторов аналогична процедуре экстракции исследуемых образцов.

- 9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
- 10. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
- 11. Отобрать надосадочную жидкость. Перенести пробирки в обычный штатив.
- 12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.
- 13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
- 14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
- 15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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 **100 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. Для отбора надосадочной жидкости без примеси магнетизированной силики необходимо повернуть пробирки на 360° вокруг своей оси, не снимая их с магнитного штатива. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая магнетизированную силику**.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот

(Проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).
Объем исследуемого материала для экстракции РНК – 1 мл или 0,2 мл.

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

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» возможно использовать с открытыми автоматическими станциями экстракции нуклеиновых кислот, использующими принцип магнитных стержней для переноса магнитного сорбента. В этом случае, программирование протокола экстракции осуществляется по инструкции

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

производителя автоматической станции в соответствии с последовательностью шагов, объемами реактивов и продолжительностью инкубаций, описанных выше в приложении 1.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК с использованием автоматической станции NucliSENS easyMAG

Проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).
Объем исследуемого материала для экстракции РНК – 1 мл или 0,2 мл.

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

Порядок работы

Вариант 1. Экстракция РНК из образца объемом 200 мкл и лизис образца вне прибора.

Данный метод экстракции позволяет в 4 раза снизить расход буфера для лизиса.

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **0,2 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **100 mkl**, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность экстракции РНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing – No, On-board Lysis Incubation – No**.
4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
5. В ячейки картриджа, предназначенные для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, внести по **900 мкл буфера для лизиса**.
6. В каждую ячейку добавить **200 мкл** исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль (ОК) и два положительных. **Для отрицательного контроля** в ячейку с буфером для лизиса добавить **200 мкл ОКО**. В пробирку, предназначенную для нижнего положительного контроля, добавить **200 мкл нижнего ПКО ВИЧ**. В ячейку,

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

предназначенную для верхнего положительного контроля, добавить 200 мкл верхнего ПКО ВИЧ. Тщательно перемешать пипетированием не менее 10 раз.

ВНИМАНИЕ! В случае необходимости проведения калибровки требуется провести экстракцию двух калибровочных образцов (калибратор А и калибратор В) не менее чем в трех повторах каждый. Процедура экстракции калибраторов аналогична процедуре экстракции исследуемых образцов.

- 8. Оставить картридж с образцами на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
- 9. Для экстракции РНК необходимо в отдельной стерильной пробирке объемом 1,5 –2 мл смешать магнитную силику и ВКО STI-AB-rec стерильным наконечником с фильтром в следующем соотношении:

Количество образцов для экстракции РНК	Количество магнитной силики, мкл	Количество ВКО STI-AB-rec, мкл
1	20	10
24 (полная загрузка прибора)	500 (объем указан с запасом на 1 пробу)	250

Пробирку тщательно перемешать. Смесь магнитной силики и ВКО STI-AB-rec хранится не более 30 мин.

- 10. Тщательно перемешать пробирку с приготовленной смесью магнитной силики и ВКО STI-AB-rec на вортексе до однородного состояния. Добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по 30 мкл смеси. Каждую ячейку тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканального дозатора отдельными наконечниками с фильтром на 200 мкл.
- 11. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов вне прибора (Off board).

После окончания экстракции РНК, извлечь картридж из прибора. Пробы РНК не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С.

Вариант 2. Экстракция РНК из образца объемом 200 мкл или 1 мл с лизисом образца в приборе

- 1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
- 2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (Matrix) для экстракции РНК – плазма (Plasma), объем образца (Volume) – 0,2 ml или 1 ml, объем элюции (Eluate) – 100 mkl, тип образца (Type) – Primary, очередность

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

- экстракции РНК в образцах (*Priority*) – *Normal*.
- 3. Создать новый протокол экстракции РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes.**
 - 4. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
 - 5. В каждую ячейку картриджа, предназначенную для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить **200 мкл или 1 мл исследуемой плазмы** отдельным наконечником с фильтром.
 - 6. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль (ОК) и два положительных. Для **отрицательного контроля** в ячейку, предназначенную для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, добавить **200 мкл или 1 мл ОКО**. В ячейку, предназначенную для нижнего положительного контроля, добавить **200 мкл или 1 мл нижнего ПКО ВИЧ**. В ячейку, предназначенную для верхнего положительного контроля, добавить **200 мкл или 1 мл верхнего ПКО ВИЧ**. Тщательно перемешать пипетированием не менее 10 раз.

ВНИМАНИЕ! В случае необходимости проведения калибровки требуется провести экстракцию двух калибровочных образцов (калибратор А и калибратор В) не менее чем в трех повторах каждый. Процедура экстракции калибраторов аналогична процедуре экстракции исследуемых образцов.

- 7. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (*On board*).
- 8. Для экстракции РНК необходимо в отдельной стерильной пробирке объемом 1,5 – 2 мл смешать **магнитную силику** и **ВКО STI-AB-rec** стерильным наконечником с фильтром в следующем соотношении:

Количество образцов для экстракции РНК	Количество магнитной силики, мкл	Количество ВКО STI-AB-rec, мкл
1	20	10
24 (полная загрузка прибора)	500 (объем указан с запасом на 1 пробу)	250

- Пробирку тщательно перемешать. Смесь магнитной силики и ВКО STI-AB-rec хранится не более 30 мин.
- 9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении *Instrument State-Idle* (примерно через 15-20 мин).
 - 10. Тщательно перемешать пробирку с приготовленной смесью магнитной силики и ВКО STI-AB-rec на вортексе до однородного состояния. Открыть крышку прибора

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **30 мкл смеси**. Содержимое каждой ячейки тщательно перемешать пипетированием с помощью многоканального дозатора отдельными наконечниками с фильтром на 200 мкл.

11. Запустить на приборе программу продолжения экстракции РНК.
12. После окончания экстракции РНК, извлечь картридж с образцами из прибора. Пробы РНК не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С.

ИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное
число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата изготовления

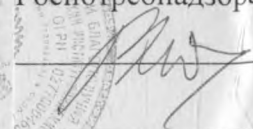


Производитель



Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 27 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В.Малеев