

«УТВЕРЖДАЮ»

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



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для количественного определения РНК вируса гепатита С  
(HCV) в клиническом материале методом полимеразной  
цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной  
детекцией в режиме «реального времени»  
**«АмплиСенс® HCV-Монитор-FL»**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....                                                                                             | 3  |
| НАЗНАЧЕНИЕ.....                                                                                                     | 3  |
| ПРИНЦИП МЕТОДА .....                                                                                                | 3  |
| ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ .....                                                                      | 4  |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....                                                                                  | 5  |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ .....                                                                | 5  |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....                                                                       | 8  |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..                                                       | 10 |
| ФОРМАТ FRT.....                                                                                                     | 11 |
| СОСТАВ .....                                                                                                        | 11 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....                                                                                   | 14 |
| ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....                                                                         | 14 |
| ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С<br>ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....            | 15 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации .....                                                                       | 15 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .....                                           | 17 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....                                                                            | 19 |
| СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ .....                                                           | 22 |
| ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....                                                                        | 23 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....                                                                                                  | 24 |
| Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12» .....                                            | 24 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2 .....                                                                                                  | 26 |
| Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».....                                                | 26 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3 .....                                                                                                  | 28 |
| Экстракция РНК с использованием автоматической станции для экстракции<br>нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG ..... | 28 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 4 .....                                                                                                  | 31 |
| Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» .....                                              | 31 |
| А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы.....                                                                       | 31 |
| Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы .....                                                                       | 33 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 5 .....                                                                                                  | 35 |
| Экстракция РНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав<br>данного набора реагентов .....   | 35 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ .....                                                                    | 38 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|                                                |                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ВКО                                            | – внутренний контрольный образец                                                                                                                                                                 |
| К–                                             | – отрицательный контроль ПЦР                                                                                                                                                                     |
| К+                                             | – положительный контроль ПЦР                                                                                                                                                                     |
| ОК                                             | – отрицательный контроль экстракции                                                                                                                                                              |
| ОКО                                            | – отрицательный контрольный образец                                                                                                                                                              |
| ОТ                                             | – обратная транскрипция                                                                                                                                                                          |
| ПК                                             | – положительный контроль экстракции                                                                                                                                                              |
| ПКО                                            | – положительный контрольный образец                                                                                                                                                              |
| ПЦР                                            | – полимеразная цепная реакция                                                                                                                                                                    |
| ФБУН ЦНИИ<br>Эпидемиологии<br>Роспотребнадзора | – Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»<br>Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| HCV                                            | – вирус гепатита С                                                                                                                                                                               |
| HDV                                            | – вирус гепатита D («Дельта»)                                                                                                                                                                    |
| FRT                                            | – флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»                                                                                                                                           |

## НАЗНАЧЕНИЕ

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

**ВНИМАНИЕ!** Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания<sup>1</sup>.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из плазмы крови совместно с ВКО, проведении реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (формат FRT). По каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ВКО. По каналу, соответствующему флуорофору JOE, детектируется продукт амплификации кДНК HCV. Положительные контрольные образцы этапа экстракции ПКО-1-HCV, ПКО-2-HCV детектируются по каналам соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (HCV). Контрольные образцы амплификации (ДНК-калибраторы) – KB1 HCV и KB2 HCV, а также калибратор HCV-Q (при использовании формы 5) аналогично детектируются по каналам, соответствующим флуорофорам FAM (ВКО) и JOE (HCV).

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

## ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате:

### Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», ОКО (4 пробирки), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 2** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, ОКО (4 пробирки), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 4** включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, ОКО (8 пробирок), «ПЦР-комплект» вариант FRT – 2 штуки.

**Форма 5** включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT, ОКО (4 пробирки), «Комплект для калибровки HCV-Q».

**Форма 6** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

*Примечание – Форма 3 удалена.*

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на силикагеле, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом преципитации, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала магнитной сепарацией, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 5 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 6 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Линейный диапазон измерения набора реагентов

| Вид клинического материала | Объем экстракции, мкл | Комплект для экстракции РНК/ДНК                    | Линейный диапазон измерения, МЕ/мл |
|----------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------|
| Плазма крови               | 100                   | «РИБО-сорб-12»<br>«РИБО-преп»<br>NucliSENS easyMAG | 300 – 100 000 000                  |
|                            | 200                   | «МАГНО-сорб»                                       | 150 – 100 000 000                  |
|                            | 1000                  | «МАГНО-сорб»<br>NucliSENS easyMAG                  | 30 – 100 000 000                   |

### Аналитическая специфичность

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

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов зарегистрированы не были.

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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, 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 реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку<sup>2</sup>, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>3</sup>. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) 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.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный

<sup>2</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

<sup>3</sup> Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы, не включающей комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп», «МАГНО-сорб»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм, включающих комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп», «МАГНО-сорб»).

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

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **ЗОНА 1. Экстракция РНК из клинического материала**

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

При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб-12» или «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147):

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
4. Одноразовые наконечники до 200 мкл.
5. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265):

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

диаметром 12 мм.

9. Автоматический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл.
10. Одноразовые наконечники до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

11. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
12. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)).

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

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

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT:

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

## ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для проведения ПЦР-исследования используется плазма периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

В отдельных случаях допускается использование сыворотки крови. Аналитическая чувствительность набора реагентов для данного материала сохраняется, однако клиническая чувствительность ввиду осаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена. Хранить сыворотку можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

**ФОРМАТ FRT****СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-сорб-12» – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i>        | <i>Описание</i>                             | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-----------------------|---------------------------------------------|------------------|---------------|
| Лизирующий раствор    | Прозрачная бесцветная жидкость <sup>4</sup> | 5,8              | 4 пробирки    |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость <sup>2</sup> | 8,0              | 4 флакона     |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость              | 15               | 4 флакона     |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость              | 8,0              | 4 флакона     |
| Сорбент               | Суспензия белого цвета                      | 0,4              | 4 пробирки    |
| РНК-буфер             | Прозрачная бесцветная жидкость              | 0,6              | 4 пробирки    |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 48 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

К комплекту реагентов «РИБО-сорб-12» прилагается следующий реагент:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО            | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2              | 4 пробирки    |

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

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

## ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагается следующий реагент:

| Реактив | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|---------|--------------------------------|-----------|------------|
| ОКО     | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2       | 4 пробирки |

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. Входит в состав формы комплектации 4.

К комплекту реагентов «МАГНО-сорб» прилагается следующий реагент:

| Реактив | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|---------|--------------------------------|-----------|------------|
| ОКО     | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2       | 8 пробирок |

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

| Реактив                | Описание                       | Объем, мл | Кол-во     |
|------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ДТТ лиофилизированный  | Порошок белого цвета           | —         | 4 пробирки |
| ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV  | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3       | 4 пробирки |
| ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2       | 4 пробирки |

<sup>4</sup> При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

**ФОРМАТ FRT**

| <i>Реактив</i>       | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| Полимераза (TaqF)    | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,02             | 4 пробирки    |
| ТМ-Реввертаза (MMIv) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01             | 4 пробирки    |
| KB1 HCV              | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1              | 4 пробирки    |
| KB2 HCV              | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1              | 4 пробирки    |
| Буфер для элюции     | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2              | 4 пробирки    |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 80 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли и калибраторы.

Входит в состав форм комплектации 1, 2, 5 (в количестве 1 шт.), 4 (в количестве 2 шт.).

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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

В составе формы комплектации 5 к «ПЦР-комплекту» прилагается следующий реагент:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| ОКО            | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2              | 4 пробирки    |

Комплект реагентов «Комплект для калибровки HCV-Q» включает:

| <i>Реактив</i>   | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| Калибратор HCV-Q | Порошок желтого цвета          | —                | 1 пробирка    |
| Растворитель Q   | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2              | 3 пробирки    |

Входит в состав формы комплектации 5.

К набору реагентов прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя программное обеспечение AmpliSens Soft Monitor FRT (в формате Microsoft® Excel) для автоматической обработки результатов.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-сорб-12»** порядок работы см. в приложении 1. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12».
- при использовании комплекта реагентов **«РИБО-преп»** порядок работы см. в приложении 2. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».
- при использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция) порядок работы см. в приложении 3. «Экстракция РНК с использованием автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG.
- при использовании комплекта реагентов **«МАГНО-сорб»** порядок работы для экстракции РНК из 1000 мкл и 200 мкл плазмы крови см. в приложении 4. «Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».
- при использовании комплектов реагентов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов, порядок работы см. в приложении 5. «Экстракция РНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов».

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL».

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

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

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

**А. Подготовка пробирок для амплификации**

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

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

1. До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых, контрольных образцов (три контроля экстракции, четыре калибратора). Тип пробирок стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционной смеси необходимо в пробирку с DTT лиофилизированным добавить все содержимое пробирки с **ОТ-ПЦР-смесью-2-FER/FRT**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки. Приготовленная смесь хранится при температуре 2-8 °С. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать реагенты из расчета на 1 реакцию: **15 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FL HCV**, **10 мкл смеси ОТ-ПЦР-смеси-2-FER/FRT** и **DTT лиофилизированного**, **1,0 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,5 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки. Для 12 (стандартная панель экстракции набором «РИБО-сорб-12») – 16 (экстракция с использованием двух картриджей EasyMag) образцов после экстракции рекомендуется готовить реакционную смесь на 20 реакций, для этого в пробирку с DTT

стр. 15 из 38

лиофилизированным добавить все содержимое пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-2-FER/FRT, все содержимое пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-1-FL HCV, все содержимое пробирки с полимеразой (TaqF) и все содержимое пробирки с ТМ-Ревертазой (MMiv). Приготовленная смесь не хранится.

4. Внести в пробирки по 25 мкл готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В готовые пробирки внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из клинических образцов. **Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.**

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб РНК, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб-12», «МАГНО-сорб» и NucliSENS easyMAG, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить **контрольные реакции**:

- а) **положительный контроль экстракции (ПК-1)** – внести в пробирку **25 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ПКО-1-HCV.
- б) **положительный контроль экстракции (ПК-2)** – внести в пробирку **25 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ПКО-2-HCV.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **25 мкл пробы РНК**, выделенной из образца ОКО.
- г) **положительный контроль ПЦР (K<sub>+1</sub>)** – внести в две пробирки по **25 мкл KB1 HCV**.
- д) **положительный контроль ПЦР (K<sub>+2</sub>)** – внести в две пробирки по **25 мкл KB2 HCV**.

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

При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K<sub>-</sub>). Для этого в пробирку с готовой реакционной смесью внести **25 мкл Буфера для элюции**.

Схема приготовления реакционных смесей

|                                     |                                            |                                            | Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом |                                                       |                         |                         |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Объем реагента на одну реакцию, мкл |                                            |                                            | 15,00                                                               | 10,00                                                 | 1,00                    | 0,5                     |
| Число клинических образцов          | Число экстрагируемых образцов <sup>6</sup> | Число исследуемых точек в ПЦР <sup>7</sup> | ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV                                               | Смесь ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT и DTT лиофилизированного | Полимераза (TaqF)       | ТМ-ревертаза (MMIv)     |
| 3                                   | 6                                          | 10                                         | 165                                                                 | 110                                                   | 11                      | 5,5                     |
| 4                                   | 7                                          | 11                                         | 180                                                                 | 120                                                   | 12                      | 6                       |
| 5                                   | 8 <sup>8</sup>                             | 12                                         | 195                                                                 | 130                                                   | 13                      | 6,5                     |
| 6                                   | 9                                          | 13                                         | 210                                                                 | 140                                                   | 14                      | 7                       |
| 7                                   | 10                                         | 14                                         | 225                                                                 | 150                                                   | 15                      | 7,5                     |
| 8                                   | 11                                         | 15                                         | 240                                                                 | 160                                                   | 16                      | 8                       |
| 9                                   | 12 <sup>9</sup>                            | 16                                         | 255                                                                 | 170                                                   | 17                      | 8,5                     |
| 10                                  | 13                                         | 17                                         | 270                                                                 | 180                                                   | 18                      | 9                       |
| 11                                  | 14                                         | 18                                         | 285                                                                 | 190                                                   | 19                      | 9,5                     |
| 12                                  | 15                                         | 19                                         | Все содержимое пробирки                                             | Все содержимое пробирки                               | Все содержимое пробирки | Все содержимое пробирки |
| 13                                  | 16 <sup>10</sup>                           | 20                                         | Все содержимое пробирки                                             | Все содержимое пробирки                               | Все содержимое пробирки | Все содержимое пробирки |

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
2. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 2, 3).

<sup>6</sup> Число клинических образцов + 3 контроля этапа экстракции РНК (N+3, N - количество клинических образцов)

<sup>7</sup> Число клинических образцов + 3 контроля этапа экстракции РНК + 4 ДНК-калибратора (N+7, N - количество клинических образцов)

<sup>8</sup> Экстракция одного стрипа на приборе NucliSENS easyMAG (8 пробирок)

<sup>9</sup> Панель из 12 пробирок для экстракции

<sup>10</sup> Экстракция двух стрипов на приборе NucliSENS easyMAG (16 пробирок)

Таблица 2

Программа «АмплиСенс-2 RG» для приборов роторного типа<sup>11</sup>

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

**ВНИМАНИЕ!** С использованием этой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов по единой программе (например, совместно с тестами для HDV, генотипирования HCV и др.). В случае, если в одном приборе одновременно проводятся только тесты для выявления ДНК HBV, можно удалить из данной программы первый шаг (50 °C – 15 мин) для экономии времени.

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

Таблица 3

Программа «АмплиСенс-2 iQ» для приборов планшетного типа<sup>12</sup>

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

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

<sup>11</sup> Например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия)

<sup>12</sup> Например, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентные

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

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

### АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

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

На основании значений порогового цикла  $C_t$  (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов KB1 и KB2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий кДНК ПКО (по каналу JOE/HEX) и ВКО (по каналу FAM) в пробе ПЦР. Полученные значения используют для расчета концентрации РНК HCV в исследуемых и контрольных образцах по формуле:

$$\frac{\text{число копий кДНК HCV в ПЦР-пробе}}{\text{число копий кДНК ВКО в ПЦР-пробе}} \times \text{коэффициент A} \times \text{коэффициент B} = \text{МЕ РНК HCV/мл плазмы}$$

Коэффициент A = 
$$\frac{100}{\text{объем экстракции, мкл}}$$

**ВНИМАНИЕ!** Для положительных контролей (ПКО-1 и ПКО-2) расчет концентрации производится без учета коэффициента A.

Коэффициент B (число копий ВКО/мл плазмы) указывается во вкладыше к данной

серии ПЦР-комплекта и не может быть использован для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий. Для **формы 5** Коэффициент В вычисляется исходя из калибровки при первой постановке набора данной серии (см. приложение 5. «Экстракция РНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов»).

**ВНИМАНИЕ!** Если результат больше чем 100 000 000 МЕ/мл, то он выдается как **результат более 100 000 000 МЕ HCV/мл**. При получении значения выше линейного диапазона образец может быть перетестирован после 10-кратного разведения; полученный результат умножают на 10. Если результат меньше чем 300 МЕ/мл при экстракции из 100 мкл образца, меньше чем 150 МЕ/мл при экстракции из 200 мкл образца, меньше чем 30 МЕ/мл при экстракции из 1 мл образца, то он выдается как **результат менее 300, менее 150, менее 30 МЕ HCV/мл**, соответственно (см. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального времени» и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL»).

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения  $C_t$  указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в режиме «реального времени» и методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 4).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Контроль        | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Результат амплификации по каналу                           |                                                                                                          |
|-----------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 |                                      | Green/FAM                                                  | Yellow/JOE                                                                                               |
| ОК              | Экстракция РНК, ПЦР                  | $Ct \leq$ значения, указанного во вкладыше (положительный) | отрицательный                                                                                            |
| ПК-1            | Экстракция РНК, ПЦР                  | $Ct \leq$ значения, указанного во вкладыше (положительный) | <b>положительный</b><br>Должен уложиться в диапазон во вкладыше по результатам расчетов через ВКО коп/мл |
| ПК-2            | Экстракция РНК, ПЦР                  | $Ct \leq$ значения, указанного во вкладыше (положительный) | <b>положительный</b><br>Должен уложиться в диапазон во вкладыше по результатам расчетов через ВКО коп/мл |
| K <sub>+1</sub> | ПЦР                                  | положительный                                              | положительный                                                                                            |
| K <sub>+2</sub> | ПЦР                                  | положительный                                              | положительный                                                                                            |
| K <sub>-</sub>  | ПЦР                                  | отрицательный                                              | отрицательный                                                                                            |

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля этапа экстракции (ПК) или положительного контроля этапа ПЦР (K<sub>+</sub>) по каналу HEX/Yellow значение  $Ct$  отсутствует или превышает указанное (граничное) значение, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых не обнаружена РНК HCV, начиная с этапа экстракции РНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу HEX/Yellow и/или отрицательного контроля ПЦР (K<sub>-</sub>) по каналам FAM/Green, HEX/Yellow зафиксировано значение порогового цикла  $Ct$ , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК HCV, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Если коэффициент корреляции  $R^2$  при построении калибровочной прямой менее 0,98, необходимо повторить амплификацию для всех проб.
4. Если рассчитанные концентрации ПК-1-HCV и ПК-2-HCV не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

## СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

**Хранение.** Комплекты реагентов «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С, «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» и набор для калибровки «HCV-Q» хранить при температуре не выше минус 16 °С. Не допускается замораживание/оттаивание ПКО-1-HCV, ПКО-2-HCV, KB1 HCV, KB2 HCV и ВКО ICZ-рес более двух раз, после размораживания ПКО-1-HCV, ПКО-2-HCV, KB1 HCV, KB2 HCV и ВКО ICZ-рес хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес. ОТ-ПЦР-смесь-1-FL HCV хранить в защищенном от света месте.

Реагент ОКО, прилагающийся к комплектам реагентов «РИБО-сорб-12», «РИБО-преп», хранить при температуре от 2 до 8 °С. Реагент ОКО, прилагающийся к комплекту реагентов «МАГНО-сорб», хранить при температуре от 2 до 25 °С. Реагент ОКО, прилагающийся к «ПЦР-комплекту» в составе формы 5, хранить при температуре не выше минус 16 °С.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru<sup>13</sup>.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора

*Родионова*

Е.Н. Родионова

Главный врач  
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

<sup>13</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

### ПРИЛОЖЕНИЕ 1

#### Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб-12»

##### Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ICZ-rec**.
4. В пробирки внести по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **лизирующего раствора и ВКО ICZ-rec** (из расчета на один образец 450 мкл лизирующего раствора и 10 мкл ВКО **ICZ-rec**) с последующим разнесением по **450 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1, ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-HCV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-2-HCV**, перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Поместить пробирки с образцами и контролями в термостат с температурой 60 °С на 10 мин. Осадить на центрифуге для сброса капель конденсата с крышки (пункт 8 выполнять только в случае одновременной экстракции РНК гепатита С и ДНК гепатита В и/или РНК гепатита D).
9. Ресуспендировать сорбент, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в

каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**.

10. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
11. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g (например, 10000 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.
12. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
13. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Отобрать раствор для отмывки 3 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 4**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 7 тыс g в течение 1 мин. Полностью отобрать раствор для отмывки 4 из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
16. Высушить сорбент, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °C на 10 мин.
17. Ресуспендировать сорбент в **50 мкл РНК-буфера**. Прогреть в термостате при температуре 60 °C 5 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 12 тыс g (например, 13400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 1 мин.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес или не выше минус 68 °C в течение года. При появлении признаков взмучивания сорбента необходимо вновь осадить сорбент на

центрифуге при 12 тыс g в течение 1 мин.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 2

#### Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

##### Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре до 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. На дно каждой пробирки внести по **10 мкл ВКО ICZ-rec**.
4. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

Примечание – При большом объеме образцов для облегчения процедуры экстракции допускается смешивание в отдельном стерильном флаконе **раствора для лизиса и ВКО ICZ-rec** (из расчета на один образец 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО ICZ-rec) с последующим внесением по **300 мкл смеси** в заранее приготовленные пробирки на 1,5 мл.

5. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя одноразовые наконечники с фильтрами. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HCV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с раствором для лизиса добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-HCV**, перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором для лизиса добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °C** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
10. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 5 мин.

11. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
16. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
17. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
20. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.  
Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C, при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 мес и не выше минус 68 °C в течение года.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

#### Экстракция РНК с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG

##### Порядок работы.

##### А. Экстракция РНК из образца объемом 100 мкл и лизис образца вне прибора.

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**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **55 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 **450 мкл смеси буфера для лизиса NucliSens**.
6. В каждую ячейку добавить **100 мкл исследуемой плазмы** отдельным наконечником с фильтром, тщательно перемешать пипетированием.
7. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК-1 со смесью буфера для лизиса NucliSens, добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**, в ячейку, предназначенную для ПК-2 с буфером для лизиса NucliSens, добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-НСV**, тщательно перемешать пипетированием.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК с буфером для лизиса NucliSens, добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
9. Оставить картридж с образцами на 10 мин при комнатной температуре для прохождения лизиса.
10. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО ICZ-rec одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 5).

| Количество образцов для экстракции РНК | Количество магнитной силики NucliSens, мкл | Количество ВКО ICZ-рес, мкл |
|----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
| 1                                      | 10                                         | 10                          |
| 8                                      | 90                                         | 90                          |
| 16                                     | 170                                        | 170                         |
| 24<br>(полная загрузка прибора)        | 250<br>(с запасом на 25 проб)              | 250                         |

11. Добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **20 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens, ВКО ICZ-рес**. Каждую ячейку тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора отдельными наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.
12. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов вне прибора (**Off board**).
13. После окончания экстракции РНК извлечь картридж из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК провести реакцию ОТ-ПЦР**.

Для длительного хранения препарата необходимо перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

#### **Б. Экстракция РНК из образца объемом 100 мкл или 1 мл с автоматическим лизисом образца в приборе.**

1. Поставить флакон с буфером для лизиса NucliSens в прибор.
2. В каждую ячейку картриджа, предназначенную для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, необходимо добавить 100 мкл или 1 мл исследуемой плазмы отдельным наконечником с фильтром.
3. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ПК-1, добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-1-HCV**, в ячейку, предназначенную для ПК-2, добавить **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО-2-HCV**.
4. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в ячейку, предназначенную для ОК, добавить **100 мкл ОКО**, тщательно перемешать пипетированием.
5. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.

6. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК – плазма (**Plasma**), объем образца (**Volume**) – **100 mkl** или **1 ml**, в зависимости от объема используемого клинического материала, объем элюции (**Eluate**) – **55 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции РНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
7. 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**.
8. Перенести запрограммированные образцы в созданный протокол.
9. Загрузить картридж с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (**On board**).
10. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle** (приблизительно 15 мин).
11. В отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл смешать магнитную силику NucliSens и ВКО ICZ-рес одноразовыми наконечниками с фильтрами (см. табл. 5).
12. Открыть крышку прибора и добавить в каждую ячейку отдельным наконечником по **20 мкл подготовленной смеси магнитной силики NucliSens и ВКО ICZ-рес**. Тщательно перемешать пипетированием с помощью дозатора одноразовыми наконечниками с фильтрами на 1000 мкл.
13. Запустить на приборе программу продолжения экстракции РНК.
14. После окончания экстракции РНК извлечь картридж с образцами из прибора и не позднее 30 мин после окончания процедуры экстракции РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.

Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

Набор реагентов при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG позволяет работать с объемами образцов 0,1 мл или 1 мл.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 4

#### Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»

##### А. Экстракция из 1000 мкл образца плазмы

##### Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции РНК из 24 образцов:
  - а) во флакон с лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл) внести **0,28 мл ВКО ICZ-рес**, все содержимое пробирки с компонентом **А (0,6 мл)** и все содержимое пробирки с **магнетизированной силикой (0,9 мл)**.
  - б) закрыть крышку флакона и **аккуратно** перемешать переворачиванием 5-7 раз, избегая образования пены.
  - в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** подготовленной смеси **лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО ICZ-рес, компонента А и магнетизированной силики**.
4. При экстракции РНК менее чем из 24 образцов:
  - а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО ICZ-рес, компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО ICZ-рес, 20 мкл компонента А и 30 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

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

  - б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО ICZ-рес, компонента А и магнетизированной силики.
  - в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** **лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл исследуемого образца плазмы** и перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором

- добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-НСV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-НСV**, перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
  8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °C на 10 мин.
  9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**.
  10. Используя наконечники без фильтра на 1000 мкл, осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
  11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**, пробирки закрыть крышкой.
  12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
  13. Ресуспендировать магнетизированную силику со стенок осторожным вортексированием, а затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
  14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать **2 мин**.
  15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
  16. Добавить **700 мкл раствора для отмывки 5**, ресуспендировать магнетизированную силику, и повторить пп. 14-15.
  17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
  18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем коротко осадить капли на вортексе.
  19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
  20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
  21. Добавить **70 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
  22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
  23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив.

## ЭКСТРАКЦИЯ РНК

Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

**ВНИМАНИЕ!** Отбор очищенной РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес или не выше минус 68 °С в течение года.

### Б. Экстракция из 200 мкл образца плазмы

#### Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО ICZ-рес, компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО ICZ-рес, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

| Количество образцов для экстракции РНК | ВКО ICZ-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 ICZ-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 **положительные контроли (ПК-1 и ПК-2)**. Для этого в приготовленную пробирку ПК-1 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-1-HCV**, в приготовленную пробирку ПК-2 с лизирующим раствором добавить **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО-2-HCV**, перемешать пробирки на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать

стр. 33 из 38

на вортексе.

9. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
10. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
11. Осторожно, по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.
13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
21. Добавить **70 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

**ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.**

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес, или не выше минус 68 °С в течение года.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 5

#### Экстракция РНК с использованием комплектов для экстракции, не входящих в состав данного набора реагентов

Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с **формой 5** гарантируются только в случае экстракции РНК при помощи комплектов реагентов, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL».

В случае, если коэффициент В для используемого комплекта реагентов/автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот не указан во вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», необходимо провести калибровку самостоятельно.

Калибровка необходима для определения коэффициента В и производится при первой постановке набора данной серии. Калибровка осуществляется один раз для каждой новой серии набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL» и проводится на используемом для экстракции РНК комплекте реагентов/автоматической станции.

Для проведения калибровки необходимо при первой постановке набора реагентов данной серии провести анализ 5 дополнительных точек: дополнительный повтор ПКО-1, дополнительный повтор ПКО-2 и Калибратор HCV-Q в трех повторях.

#### Подготовка Калибратора HCV-Q к работе:

1. Осадить на вортексе содержимое пробирки, содержащей реагент **Калибратор HCV-Q**, и аккуратно открыть крышку и, избегая распыления содержимого, добавить **400 мкл Растворителя Q**, используя одноразовые наконечники с фильтрами.
2. Плотнo закрыть пробирку и оставить на 20 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе.
3. После полного растворения открутить содержимое пробирки **калибратор HCV-Q** на вортексе в течение 3-5 с для сброса капель жидкости с крышки.

Калибровку необходимо проводить на используемом для экстракции РНК комплекте реагентов. Процедура экстракции РНК проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов/автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот. Обязательным условием является внесение ВКО ICZ-рес в

## ЭКСТРАКЦИЯ РНК

образцы или лизирующего раствора до начала экстракции в объеме 10 мкл на одну пробу.

В случае если экстракция РНК проводится из 100 мкл плазмы – внести по 100 мкл растворенного калибратора HCV-Q в три пробирки для экстракции нуклеиновых кислот.

В случае если экстракция РНК проводится из прочего объема плазмы (100-1000 мкл) – внести в три пробирки, подготовленные для экстракции РНК, по 100 мкл растворенного калибратора HCV-Q и довести растворителем Q объем образца до используемого объема экстракции нуклеиновых кислот (например, при экстракции из 1 мл внести 100 мкл растворенного калибратора HCV-Q и 900 мкл растворителя Q).

После окончания экстракции РНК провести реакцию ОТ-ПЦР в соответствии с данной инструкцией.

Средние значения концентрации по каналам FAM и JOE/HEX, полученные для трёх повторов калибратора HCV-Q, использовать в количественных расчетах для определения коэффициента В по следующей формуле:

$$\text{Коэффициент В} = \frac{\text{число копий ДНК ВКО (канал FAM) в калибраторе HCV-Q}}{\text{число копий кДНК HCV (канал JOE/HEX) в калибраторе HCV-Q}} \times \text{Коэффициент С}$$

Коэффициент С указан во вкладыше к данной серии набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL».

**ВНИМАНИЕ!** Вычисленное значение коэффициента В должно укладываться в диапазон, указанный во вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL» данной серии.

Вычисленное значение коэффициента В записать во вкладыш для данной серии набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL» и использовать для расчета концентрации РНК HCV в исследуемых и контрольных образцах (см. раздел «Анализ и интерпретация результатов»).

Также см. методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL».

Значения, вычисленные для ПКО-1-HCV и ПКО-2-HCV, записать во вкладыш для данной серии набора реагентов «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL».

Найти среднее значение для ПКО-1-HCV и среднее значение для ПКО-2-HCV. Установить диапазон допустимых значений для ПКО-1-HCV и ПКО-2-HCV: от

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК**

---

«вычисленное среднее значение»/3 до «вычисленное среднее значение»х3. Например, вычисленные значения для двух повторов ПКО-1-НСV составляют 500 000 МЕ/мл и 700 000 МЕ/мл, тогда «вычисленное среднее значение» ПКО-1-НСV = 600 000 МЕ/мл, а диапазон допустимых значений для ПКО-1-НСV = 200 000-1800 000 МЕ/мл.

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Изготовитель

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 38  
тридцать восемь листов

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора (Доверенность № 8 от 28.11.2018 г.)

« 14 » октября 20 19 г.

А.В. Горелов

