

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
«21» августа 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации РНК вируса денге
(*Dengue virus*, DV) 1-4 типов в биологическом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Dengue virus* type-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
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.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	8
ФОРМАТ FRT.....	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	12
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	12
Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»	13
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, гомогенатов тканей мозга и внутренних органов, комаров с применением комплекта реагентов «РИБО- преп»	18
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- Внутренний контрольный образец
В-	- Отрицательный контроль экстракции
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
кДНК	- Комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- Нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
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
DV	- <i>Dengue virus</i> , вирус денге
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Dengue virus type-FL*» предназначен для выявления и дифференциации РНК вируса денге 1-4 типов в клиническом (плазма и сыворотка крови) и аутопсийном материалах от людей (ткани мозга, печени, селезенки), материале от животных (ткани мозга, селезенка), в комарах методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК DV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию РНК из образцов биологического материала, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК DV с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT). Экстракция РНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводятся обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификация участков кДНК DV 1-4 типов при помощи специфичных к данным участкам кДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют

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

флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых кДНК-мишеней, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

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 реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – 2 штуки.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в зависимости от вида исследуемого материала.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

Вид биологического материала	Объем исследуемой пробы	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Тип вируса денге	Пробоподготовка материала
Плазма / сыворотка крови, суспензия комаров	100 мкл	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5×10^3	1-4 тип	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы
Плазма крови, сыворотка крови	1 мл	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5×10^2	1-4 тип	

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах (вирус клещевого энцефалита, Японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки);
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii* ssp. *caspia*, *R. hejlsonjiangensis*);
- *Coxiella burnetii*;
- *Bartonella quintana*;
- хантавирусах: Пуумала, Добrava;
- *Leptospira interrogans*, *L. kirshneri*, *L. borgpetersenii*.

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также с ДНК человека, ДНК комаров, ДНК грызунов не выявлено ложноположительных результатов.

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

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
2. Гомогенизатор TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации аутопсийного материала и комаров.
3. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм.
4. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого биоматериала) – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «МАГНО-сорб» (ТУ 9398-106-01897593-12) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 1
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с» «Ламинарные системы», Россия).
7. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах (например, Ахугеп, США).
10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
11. Одноразовые пролипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
12. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК.
14. Отдельный халат, шалочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.

16. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл:
- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат: плазма крови, сыворотка крови, аутопсийный материал (ткани мозга, внутренних органов), комары.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Плазма крови, сыворотка крови

Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают. Для отбора плазмы пробирку с кровью центрифугируют в течение 20 мин при 1600 g.

Для получения сыворотки крови взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в сухую пробирку. Для формирования сгустка кровь отстаивают 30 мин при 37 °С, после чего пробирку центрифугируют в течение 20 мин при 1600 g. Для исследования отбирают 100 мкл клинического материала при экстракции РНК с использованием комплекта «РИБО-преп» или 1 мл клинического материала при экстракции РНК с использованием комплекта «МАГНО-сорб».

Аутопсийный материал (ткани мозга и внутренних органов)

Данный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации тканей

внутренних органов: объем PBS-буфера или 0,15 М раствора NaCl для гомогенизации определяется объемом гомогенизируемой ткани – соотношение ткань-буфер определяется как 1:9, то есть готовится 10 % суспензия. Общий объем пробы для пробирок объемом 1,5 мл не должен превышать 1 мл. Условия гомогенизации для тканей мозга: диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 2-3 минуты; для тканей печени, селезенки: диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 10 мин. Для экстракции РНК берут 30 мкл суспензии.

Комары

Для приготовления суспензий комаров используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации комаров (диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 5 мин; объем буфера – 1000 мкл (пул из 25 комаров). Предварительно формируют пулы комаров (не более 25 особей комаров рода *Aedes*). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 40 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Допускается хранение вышеперечисленного биологического материала до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Для аутопсийного материала и комаров предусмотрены следующие режимы хранения: ткани внутренних органов и комаров хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, длительно – при температуре минус 68 °С.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

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

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

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ³	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ³	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. Входит в состав формы комплектации 3.

² При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов. ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного набора реагентов имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

³ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участков генома вируса денге 1-4 типов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT DV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
K+ DV 1-4 типов / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2 в количестве 1 шт., в состав формы комплектации 3 – в количестве 2 шт.

К комплекту реагентов прилагаются следующие реагенты:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок
ВКО STI-87-гес	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Обратная транскрипция и амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса денге (*Dengue virus*, DV) 1-4 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-

ФОРМАТ FRT

флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Dengue virus type-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции РНК из плазмы и сыворотки крови, гомогенатов тканей внутренних органов и мозга, комаров в соответствии с Приложением 1 «Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, гомогенатов тканей мозга и внутренних органов, комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК из 1 мл плазмы и сыворотки крови в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-рес). При использовании формы комплектации 3 в качестве отрицательного контроля этапа экстракции используется реагент ОКО.

При использовании формы комплектации 2 для экстракции РНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

При использовании формы комплектации 3 для экстракции РНК используется входящий в набор комплект реагентов «МАГНО-сорб».

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

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.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций – смешать в отдельной пробирке ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT DV, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIV) и RT-G-mix-2, из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT DV;
- 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT;
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF);

ФОРМАТ FRT

- 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv);
- 0,25 мкл RT-G-mix-2.

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией трех контрольных образцов: отрицательного контроля экстракции (В–), положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+ и К–).

2. Внести в каждую пробирку по 15 мкл подготовленной смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить.

3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

4. Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл К–.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл К+ DV 1-4 типов / STI.
- в) отрицательный контроль экстракции (В–) – внести в пробирку 10 мкл пробы «В–», полученной на этапе экстракции РНК.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и образцов РНК и контролей.

Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»

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

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного типа ⁴			Приборы планшетного типа ⁵		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	5	95	10 с	5
	56	35 с		56	40 с	
	72	15 с		72	20 с	

⁴ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

ФОРМАТ FRT

4	95	10 с	40	95	10 с	40
	54	35 с детекция флуоресц. сигнала		54	40 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	20 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по пяти каналам – для флуорофоров FAM⁶, JOE⁶, ROX⁶, Cy5⁶, Cy5.5⁶.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса денге 1;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса денге 2;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса денге 3;
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса денге 4;
- по каналу для флуорофора Cy5.5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО.

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

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

⁶ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Соответствие мишеней и каналов детекции

Детекция по каналу для флуорофора				
FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
DV 1	DV 2	DV 3	DV 4	ВКО

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК DV соответствующего типа **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК DV любого типа **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение, а по соответствующим типу DV каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 значение порогового цикла не определено или больше указанного.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора FAM JOE, ROX, Cy5 и по каналу для флуорофора Cy5.5 значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса денге (*Dengue virus*, DV) 1-4 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Dengue virus* type-FL» разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t по каналу для флуорофора				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
B-	Экстракция РНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла C_t по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК по данному каналу.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (B-) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5 определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на данном канале или каналах.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (K-) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5 определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на каком-либо из каналов с постановкой K- не менее чем в трех повторах.

ФОРМАТ FRT

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

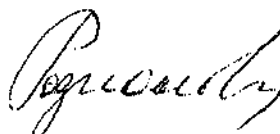
Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» (кроме RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT DV, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF) и ТМ-Реввертазы (MMIv)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT DV, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF) и ТМ-Реввертазу (MMIv) хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT DV хранить в защищенном от света месте.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Dengue virus type-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)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ



Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»



Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, гомогенатов тканей мозга и внутренних органов, комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками, включая отрицательный контроль экстракции (В-). Внести в каждую пробирку по 10 мкл **ВКО STI-87-rec**. Добавить в пробирки по 300 мкл **раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-rec** для исследуемых проб внести по 30 мкл исследуемых суспензий гомогенатов тканей мозга или внутренних органов, или по 100 (возможно 200) мкл плазмы (или сыворотки) или по 100 мкл суспензий комаров.
4. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В-) вносятся 10 мкл **ВКО STI-87-rec** и 300 мкл **раствора для лизиса**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате. Добавить в пробирки по 400 мкл **раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 10 000 g.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по 500 мкл **раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при 10 000 g в течение 2 мин на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по 200 мкл **раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при 10 000 g в течение 2 мин на микроцентрифуге.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к реакции обратной транскрипции и ПЦР.

СИМВОЛЫ, 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



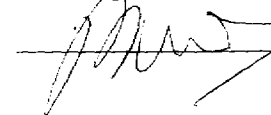
Дата изготовления



Производитель

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 20 листов

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В.Малеев