

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
«15» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической
лихорадки (ККГЛ, CCHFV – *Crimean-Congo hemorrhagic fever
virus*) в биологическом материале методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией
продуктов амплификации в агарозном геле

«АмплиСенс® CCHFV-EPh»

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.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	8
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации	13
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	14
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из исследуемого материала	18
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
кДНК	- комплементарная ДНК
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
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
EPH	- электрофоретическая детекция

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *CCHFV-EPH*» предназначен для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*CCHFV*) в клещах, сыворотке и плазме крови методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

Для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции используются наборы, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК *CCHFV* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и электрофоретической детекцией включает в себя 4 этапа: экстракцию РНК из образцов биологического материала, получение кДНК в ходе реакции обратной транскрипции, амплификацию участка кДНК *CCHFV* и электрофоретическую детекцию. Экстракция РНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-1 *CCHF*-рес или ВКО-2 *CCHF*-рес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции, в ходе которой получают кДНК. Пробы кДНК используются для амплификации участка кДНК *CCHFV* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. Специфический

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

продукт амплификации имеет определенный размер и детектируется методом электрофореза в агарозном геле.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл);

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл);

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции, амплификации кДНК и электрофоретической детекции.

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для амплификации кДНК **CCHFV**. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК «РИБО-сорб» и «РИБО-золь-С», для проведения реакции обратной транскрипции комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» и для электрофоретической детекции комплект реагентов «ЭФ» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

продукт амплификации имеет определенный размер и детектируется методом электрофореза в агарозном геле.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,5 мл);

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R (пробирки 0,2 мл);

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции, амплификации кДНК и электрофоретической детекции.

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для амплификации кДНК *CCHFV*. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК «РИБО-сорб» и «РИБО-золь-С», для проведения реакции обратной транскрипции комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» и для электрофоретической детекции комплект реагентов «ЭФ» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Комплект для выделения РНК	Комплект для амплификации	Комплект для обратной транскрипции	Аналитическая чувствительность	Комплект для детекции	Пробоподготовка материала
Сыворотка и плазма крови	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект»	«РЕВЕРТА-L»	10^4 ГЭ/мл ²	«ЭФ» 200	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы
Иксодовые клещи	«РИБО-золь-С»	«ПЦР-комплект»	«РЕВЕРТА-L»	3×10^4 ГЭ/мл	«ЭФ» 200	

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах: вирус Западного Нила, Лангат, Повассан, Японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки;
- герпесвирусах: HHV I, II типов, EBV, CMV, HHV VI типа;
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок: *Rickettsia conorii* sub *caspia*, *R.heilongiangensis*; *Coxiella burnetii*;
- ДНК человека, ДНК клещей *H.marginatum marginatum*, *H.scupense*, *D.marginatus*, *D.reticulatus*, *R.rossicus*, *R.sanguineus*, *H.punctata*, *I.ricinus*.

При исследовании вышеперечисленных ДНК 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:

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала.

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- 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 (включая буфер и гели) 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.

- 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.

При работе с биологическим материалом следует соблюдать следующие меры предосторожности:

- в случае работы с клещом с высокой степенью напитанности рекомендуется перед гомогенизацией клеща в ступке проколоть его одноразовой иглой для выхода крови и предупреждения разбрызгивания материала при растирании.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ

1. Посуда и инструменты (иглы), использованные для гомогенизации клещей, выдерживаются в 0,2 % растворе ДП-2Т в течение 1 сут, после чего фарфоровая посуда моется водопроводной водой, затем на 30 мин погружается в раствор хромовой смеси и после отмыwania в проточной и деионизованной воде высушивается в сухожаровом шкафу в течение 4 ч при температуре 180 °С.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS буфер) и 96% этиловый спирт для проведения пробоподготовки клещей.
2. Комплект реагентов для выделения РНК из сыворотки и плазмы крови – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) и комплект реагентов для выделения РНК из суспензий клещей – «РИБО-золь-С» (ТУ 9398-074-01897593-2008) при работе с формами комплектации 3,4.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.
4. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при работе с формами комплектации 3, 4.
5. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» (ТУ 9398-070-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора при работе с формами комплектации 3, 4.
6. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции.
7. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
8. Центрифуга/вортекс.
9. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
10. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
11. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).

12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК.
13. Амплификатор для пробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия, или эквивалентный); для пробирок 0,2 мл (например, GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, США, или MaxyGene, Axygen, США или эквивалентный).
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Материалом для исследования служат: образцы сыворотки и плазмы крови, суспензии клещей.

Получение плазмы крови.

Взятие крови производится натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа Venoject (с ЭДТА), Vacuette® (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА). При взятии в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносится в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6 % раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или 3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 1:9).

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Пробирка закрывается крышкой и переворачивается несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом).

Плазму крови получают центрифугированием цельной крови при 800-1600 g в течение 20 мин. Затем отбирают плазму отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл. Для экстракции РНК используют 100 мкл образца плазмы.

Получение сыворотки крови.

Возможно использование сыворотки в качестве материала для обнаружения РНК вируса *СCHF*. Взятие крови производится натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную

вакуумную систему типа Venoject, Vacuette® без ЭДТА. При взятии в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносится в одноразовую пластиковую пробирку без антикоагулянта. Кровь отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин. Переносят сыворотку отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой.

Для экстракции РНК используют 100 мкл образца сыворотки крови.

Хранить плазму и сыворотку крови можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес при температуре не выше минус 16 °С, в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. При замораживании клинического материала его транспортировка должна проводиться в замороженном состоянии.

Подготовка суспензий клещей.

Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полунапитавшихся - по 2-3; полностью напитавшихся - по 1. Исследуемых клещей помещают в пробирки типа «Эппендорф», добавляют 1 мл 96 % этанола и встряхивают на вортексе. Пробирку центрифугируют в течение 3-5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно удаляют с помощью вакуумного отсасывателя. Затем в эту же пробирку с клещами добавляют 1 мл физиологического раствора (0,15 М раствора хлорида натрия), встряхивают на вортексе, центрифугируют в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно удаляют с помощью вакуумного отсасывателя. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. В случае гомогенизации напитавшихся клещей их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растирают в 700 мкл физиологического раствора (0,15 М раствора хлорида натрия), смешивая раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют 1 мин при 13 тыс об/мин и отбирают 150 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ³	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ³	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «РИБО-золь-С» вариант 50 (ТУ 9398-074-01897593-2008) – комплект реагентов для первого этапа выделения РНК из биологического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор А	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	15	1 флакон
Раствор В	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 флакон
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость ³	20	1 флакон
Раствор Е	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 проб, включая контроли.

³ При хранении лизирующего раствора, раствора для отмывки 1 и раствора D при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 (ТУ 9398-005-01897593-2008) – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	5 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R – комплект реагентов для амплификации кДНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-R CCHF раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
2,5х ПЦР-буфер blue	Прозрачная жидкость синего цвета	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка
ПКО кДНК CCHF	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции РНК:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета	1,6	1 пробирка
ПКО CCHF-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	5 пробирок
ВКО-1 CCHF-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок
ВКО-2 CCHF-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок

Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200 (ТУ 9398-070-01897593-2008) – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл Масса, г	Кол-во
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации.
- Электрофоретическая детекция продуктов амплификации и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения РНК из клинического материала.

Для экстракции РНК *СCHFV* из плазмы и крови пациентов используется набор реагентов «РИБО-сорб», из суспензии клещей – набор «РИБО-золь-С», рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Экстракция РНК из каждого биологического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-1 *СCHF-rec* при экстракции из плазмы и сыворотки крови, и ВКО-2 *СCHF-rec* – при экстракции из суспензии клещей.

При использовании форм комплектации набора 1, 2 для экстракции РНК применяются входящие в набор комплекты реагентов «РИБО-сорб» и «РИБО-золь-С» (порядок работы см. в приложении 1).

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

1. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке $10 \cdot (N+1)$ мкл 2,5х ПЦР-буфер blue и $0,5 \cdot (N+1)$ мкл полимеразы (TaqF).
2. Перемешать смесь на вортексе и раскатать по 10 мкл в пробирки с ПЦР-смесью-1-R CCHF для проведения ПЦР.
3. Сверху добавить по 1 капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Б. Проведение амплификации

1. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл кДНК-проб, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
2. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК CCHF.
3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1).
4. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Программа амплификации кДНК CCHFV

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):									
цикл	«Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)			MaxyGene (Axygen)		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		93 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	15 мин	1	94 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	10 с	42	94 °С	10 с	42	95 °С	15 с	42
	60 °С	10 с		60 °С	30 с		60 °С	30 с	
	72 °С	15 с		72 °С	35 с		72 °С	30 с	
3	72 °С	2 мин	1	72 °С	2 мин	1	72 °С	2 мин	1
4	10 °С	хранение		4 °С	хранение		4 °С	хранение	

4. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов амплификации (ЗОНУ 3). Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов кДНК в агарозном геле.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекцию провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации «ЭФ» вариант 50.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной кДНК (см. табл.2).

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов кДНК:

CCHFV

– 281 п.н.,

ВКО

– 504 п.н.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		полоса 281 п.н.	полоса 504 п.н.
ПК	Экстракция РНК	Есть	Есть
ОК	Экстракция РНК	Нет	Есть
К–	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Нет

1. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа выделения (ПК), должны быть две яркие светящиеся оранжевые полосы: специфическая – на уровне **281 п.н.** и полоса внутреннего контроля – на уровне **504 п.н.**
2. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК), должна быть только полоса ВКО на уровне **504 п.н.**
3. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+), должна быть яркая специфическая светящаяся оранжевая полоса на уровне **281 п.н.**
4. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К–) не должно быть никаких полос.
5. Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне **281 п.н.** большей или меньшей интенсивности, независимо от наличия или отсутствия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контроля может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией РНК вируса *СCHF*.
6. Отрицательными считаются образцы, которые содержат только полосу **504 п.н.** большей или меньшей интенсивности (за исключением отрицательного контроля этапа ПЦР – (К–)).
7. Кроме полос **281 п.н.** и **504 п.н.**, в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в табл. 2, то соответствующий этап анализа следует переделать.
2. Если в дорожке какой-либо из исследуемых проб отсутствуют обе полосы длиной 281 п.н. и 504 п.н. результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой пробы с этапа экстракции РНК. Причиной могла явиться ошибка в процедуре обработки

материала, приведшая к потере РНК или ингибированию ОТ и/или ПЦР.

3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
2. Появление специфической полосы 281 п.н. в любом из отрицательных контролей (ОК, К-) указывает на контаминацию реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считают недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

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. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-золь-С», «ПЦР-комплект» (кроме полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L», полимеразу (TaqF) (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® CCHFV-EPh» 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)⁴.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»



Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

⁴ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из исследуемого материала

А. Экстракция РНК из образцов сыворотки и плазмы крови при помощи комплекта реагентов «РИБО-сорб»

Объем пробы, необходимый для экстракции РНК – 0,1 мл

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **5 мкл ВКО-1 CCHF-гес**, затем добавить по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО-1 CCHF-гес** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О CCHF-гес**.
5. Содержимое плотно закрытых пробирок тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
6. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
7. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 9 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 9 тыс об/мин. на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Центрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

10. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя пункту 9.
11. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °С на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
13. В пробирки добавить по **40 мкл РНК-буфера**, используя свободный от РНКаз наконечник с фильтром.
14. Перемешать содержимое пробирок на вортексе. Поместить в термостат при температуре 56 °С на 5 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 2 мин.

Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Полученный препарат РНК хранению не подлежит. Реакцию обратной транскрипции следует проводить не позднее чем через 30 мин после получения РНК-пробы.

Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, отобрать раствор РНК, перенести в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

Б. Экстракция РНК из суспензий клещей при помощи комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб»

Порядок работы.

I этап

1. **Раствор D** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **5 мкл ВКО-2 CCHF-рес**, затем добавить по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с раствором D и ВКО-2 CCHF-рес добавить по **150 мкл**

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

- подготовленных проб суспензий клещей, используя наконечники с фильтром.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **150 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **140 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО CCHF-rec**.
 5. Содержимое плотно закрытых пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть при 56 °C в течение 5 минут, после чего центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
 6. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин.
 7. В эти же пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин.
 8. В эти же пробирки внести **100 мкл раствора B**, перемешать на вортексе в течение 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °C) на 10 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 13 тыс об/мин.
 9. В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **400 мкл лизирующего раствора** и промаркировать соответственно номерам проб.
 10. После центрифугирования раствор должен разделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно 450 мкл), не захватывая нижний слой, и перенести ее в пробирку с лизирующим раствором. Тщательно перемешать смесь.

II этап

1. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
2. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 5 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
3. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

4. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 45 с при 9 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
5. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя пункту 4.
6. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
7. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °C на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
8. В пробирки добавить по **40 мкл РНК-буфера**, используя свободный от РНКаз наконечник с фильтром.
9. Перемешать содержимое пробирок на вортексе. Поместить в термостат при температуре 56 °C на 5 мин (встряхивая пробы на вортексе каждую минуту). Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 2 мин.

Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Полученный препарат РНК хранению не подлежит. Реакцию обратной транскрипции следует проводить не позднее чем через 30 мин после получения РНК-пробы.

Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, отобрать раствор РНК, перенести в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 68 °C в течение года.

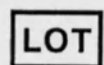
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



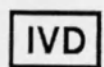
Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



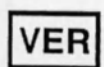
Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



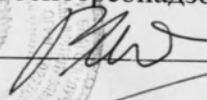
Дата изготовления



Производитель

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 22 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В.Малеев

