

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 03.02.2012 № 340-Пр/12

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
«01» августа 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] CCHFV-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	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	11
ФОРМАТ FRT.....	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	15
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	15
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	15
А. Подготовка пробирок для амплификации	15
Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени».....	17
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	21
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	22
Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-преп».....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	24
Экстракция РНК из клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-золь-В»	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ОК	- отрицательный контроль экстракции РНК
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	-положительный контроль экстракции РНК
ПКО	- положительный 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
<i>СCHFV</i>	- <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i> , вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *СCHFV-FL*» предназначен для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*СCHFV*) в клиническом материале (плазма и сыворотка крови) и клещах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *СCHFV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракция РНК из образцов биологического материала, обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация участка кДНК *СCHFV* и гибридизационно-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

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

процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификация участка кДНК *CSHFV* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, 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 происходит 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;

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 4 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала (объем исследуемой пробы)	Комплект для выделения РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Пробоподготовка материала
Сыворотка крови (100 мкл) Клещи <i>H. marginatum</i> пулы (50 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^3	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом объеме исследуемой пробы
Клещи <i>H. marginatum</i> пулы (100 мкл)	«РИБО-золь-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^3	

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах (вирус Западного Нила, Омской геморрагической лихорадки);
- герпесвирусах (I и II типов, CMV, EBV, VZV, IV типа), энтеровирусах (ECHO, Coxsackie);
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii* ssp. *caspia*, *Coxiella burnetii*);
- ортобуньявирусах (вирус Тягини, Батаи);
- хантавирусах (Пумала, Добрава);

- тогатовирусах (Баткен).

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека и ДНК клещей ложноположительных результатов выявлено не было.

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.
- Удалять неиспользованные реактивы 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.

- 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.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с Директивой Европейского Союза 67/548/ЕЕС следующие реагенты подлежат маркировке, как содержащие опасные вещества, а также требуют указания факторов риска (R) и мер предосторожности (S):

Наименование реагента	Наименование комплекта, в который входит реагент	Наименование опасного (в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС) вещества	Код опасности, перечень факторов риска (R) и мер предосторожности (S) в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС	по ГН 2.2.5.1313-03 ²			
				ПДК макс разовая/среднесменная	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для лизиса	«РИБО-преп»	Гуанидин тиоцианат	Harmful ³ R:20/21/22-32-52/53 S:13-61	Нет данных			
Раствор D	«РИБО-золь-В»						
Раствор для преципитации	«РИБО-преп»	Изопропанол	Highly flammable. Irritant ³ R:11-36-67 S:7-16-24/25-26	50/ 10	Пары	Класс опасности 3	не требуется
Раствор С	«РИБО-золь-В»						
Раствор А	«РИБО-золь-В»	Фенол	Toxic, Corrosive ³ R: 23/24/25-34-48/20/21/22-68 S: 24/25-26-28-36/37/39-45	1/ 0,3	Пары	Класс опасности 2	не требуется
Раствор В	«РИБО-золь-В»	Хлороформ	Harmful ³ R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	10/ 5	Пары	Класс опасности 2	не требуется
Раствор для отмывки 3	«РИБО-преп» «РИБО-золь-В»	Этанол	Highly flammable ³ R:11 S:7-16	2000, 1000	Пары	Класс опасности 4	не требуется
раствор для отмывки 4	«РИБО-преп»						

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

R11: легко воспламеняется.

R20/21/22: опасен при проглатывании, контакте с кожей или вдыхании.

R22: опасен при проглатывании.

R23/24/25: ядовит при вдыхании, контакте с кожей и при проглатывании.

² Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

³ Используются данные о коде опасности, факторах риска (R) и мерах предосторожности (S) фирмы Sigma-Aldrich (harmful - вредный для здоровья, highly flammable – легко воспламеняющийся, irritant - вызывающий раздражение, toxic- токсичный, corrosive-коррозивный).

R32: при контакте с кислотой образует токсичный газ.
R34: вызывает ожоги.
R36: раздражает слизистую глаз.
R38: раздражает кожу.
R40: ограниченное число доказательств канцерогенного эффекта.
R48/20/22: опасность серьезного вреда для организма при длительном вдыхании и приеме внутрь.
R48/20/21/22: опасность серьезных повреждений организма при длительном вдыхании, контакте с кожей или при приеме внутрь.
R52/53: опасен для водных организмов, может вызывать долговременное нежелательное воздействие на водную среду.
R67: пары вещества могут вызывать сонливость и головокружение.
R68: риск необратимых последствий.
S7: держать емкость плотно закрытой.
S13: держать вдали от пищевых продуктов и напитков, продуктов для животных.
S16: держать вдали от источников огня, не курить.
S24/25: избегать контакта с кожей и глазами.
S26: в случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.
S28: после попадания на кожу промыть большим количеством воды.
S36/37: использовать соответствующую защитную одежду и перчатки.
S36/37/39: использовать соответствующую защитную одежду, перчатки и маску/очки.
S45: в случае происшествия или ухудшения самочувствия немедленно обратиться за медицинской помощью.
S61: избегать попадания в окружающую среду.

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

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; рН=7,5±0,2).
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого биоматериала) – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «РИБО-золь-В» (ТУ 9398-073-01897593-2008), или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 1.
 3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
 4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации клещей.
 5. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 7 мм.
 6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 7. Центрифуга/вортекс.
 8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
 9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах.
 10. Штативы для пробирок объемом 0,2 и 0,1 мл.
 11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
 12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК/РНК.
 13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 14. Емкость для сброса наконечников.
 15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 (ДНК-технологии, Россия) или аналогичные).
 16. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с

плоской крышкой или 0,1 мл (например, Axugen, 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, 2008 г.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

1. 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 г. Сыворотку крови получают стандартными методами. Для исследования отбирают 100 мкл клинического материала.
2. Клещи. Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полупитавшихся – по 2-3; полностью питающихся – по 1. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации клещей рода *Hyalomma* (диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 12-15 мин; объем буфера – 700 мкл (ненапитавшийся клещ), 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей). В случае гомогенизации питающихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей предварительно отмывают в 70 % этаноле в случае если клещ загрязнен маслом. Клещей растирают в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща) или в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или питавшегося клеща) 0,15 М раствора хлорида натрия или PBS-буфера, смешивая

раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин и отбирают 50 мкл надосадочной жидкости для выделения РНК с набором «РИБО-преп». РНК из полностью напитавшихся клещей рекомендуется выделять с применением набора реагентов «РИБО-золь-В». В этом случае для выделения РНК отбирают 100 мкл осветленной клещевой суспензии.

Допускается хранение вышеперечисленного клинического материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Клещей хранят или живыми (до 1 мес) или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее - при температуре минус 70 °С.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участка генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT CCHFV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК CCHFV / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

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

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
ПКО CCHFV-FL-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	5 пробирок
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ТРНК 1 мкг/мкл	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – 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 ⁴	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 из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 (ТУ 9398-073-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор E	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
Раствор A	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	15	1 флакон
Раствор B	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка
Раствор C	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

⁴ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с гибридационно-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 РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CCHFV-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК CCHFV из различных биологических объектов рекомендуется использовать следующие комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- **«РИБО-преп»** – экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, суспензии голодных и полунапитавшихся клещей;
- **«РИБО-золь-В»** – экстракция РНК из суспензии полностью напитающихся клещей.

При использовании формы комплектации 2 экстракция РНК проводится с помощью комплекта «РИБО-преп» в соответствии с Приложением 1. При использовании формы комплектации 3 экстракция РНК проводится с помощью комплекта «РИБО-золь-В» в соответствии с Приложением 2.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в

режиме «реального времени».

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

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

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций - смешайте в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT CCHFV**, **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 CCHFV**;
- **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**;
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**;
- **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**;
- **0,25 мкл RT-G-mix-2**.

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум четырех контрольных образцов: положительного контроля экстракции (ПК), отрицательного контроля экстракции (ОК), 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 ОТ-ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
- б) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК CCHFV / STI**.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и проб 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 ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	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
	54	25 с		54	30 с	
	72	15 с		72	15 с	
4	95	10 с	45	95	10 с	45
	50	25 с детекция флуоресц. сигнала		50	35 с детекция флуоресц. сигнала	
		72			15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/Yellow/HEX.

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 используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

⁵ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или аналогичные.

⁶ Например, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 (ДНК-технологии, РФ) или аналогичные.

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО STI-87-rec;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *ССНFV*.

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 *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *ССНFV* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК *ССНFV* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE значение порогового цикла не определено или превышает указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE, и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* 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 *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической

лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CCHFV-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора FAM
ОК	Экстракция РНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
ПК	Экстракция РНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
2. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить экстракцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE.

4. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE, с постановкой К– не менее чем в трех повторах.

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 разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-В» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. РНК-элюент (из комплекта «РИБО-золь-В»), RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *СCHFV*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимераза (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и тРНК 1 мкг/мкл (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *СCHFV* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *СCHFV-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) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: products@pcr.ru)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н.Родионова

Директор ФГУЗ Ставропольский
научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора



А.Н.Куличенко

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, клещей 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 и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87-rec** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-rec** внести по **50 мкл** суспензий клещей либо по **100 мкл** плазмы, сыворотки.
4. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**, затем добавить **10 мкл ПКО CCHFV-FL-rec**.
5. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **только 10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**.
6. 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.
7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.

11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Процентрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
17. Процентрифугировать пробирки при **10 000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция РНК из клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-золь-В»

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87-гес**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки с **раствором D** и **ВКО STI-87-гес** внести по **100 мкл** суспензий клещей.
3. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ВКО STI-87-гес** и **300 мкл раствора D**, затем **80 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО CCHFV-FL-гес**.
4. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **10 мкл ВКО STI-87-гес** и **300 мкл раствора D**, затем **90 мкл ОКО**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 56 °С** в термостате. Процентрифугировать на вортексе для удаления капель с крышки пробирки.
6. Добавить к раствору **30 мкл раствора E**. Перемешать на вортексе процентрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
7. Добавить к раствору **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и процентрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
8. Добавить к раствору **100 мкл раствора B**. Перемешивать на вортексе 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым).
9. Поставить пробирки в холодильник (температура от 2 до 4 °С) на 10 мин.
10. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. В процессе центрифугирования раствор разделится на две фазы: нижнюю, содержащую белки и ДНК, и верхнюю – водную, содержащую РНК.
11. Отобрать новые пробирки на 1,5 мл, в которые необходимо внести **300 мкл раствора C**. Промаркировать пробирки. В пробирки с отрицательным и положительным контролем

экстракции (промаркированы **ОК** и **ПК**) внести по **10 мкл РНК 1 мкг/мкл**.

12. Аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно 400 мкл), используя наконечники с фильтром и перенести в пробирку с раствором С. Перемешать на вортексе и выдержать в морозильнике при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 ч.
13. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
14. Растворить осадок в **100 мкл раствора D**, добавить **100 мкл раствора С**, перемешать на вортексе. Выдержать в морозильнике при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 ч.
15. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
16. Осадок промыть в **800 мкл охлажденного при температуре плюс 2 до 8 °С раствора для отмывки 3**, перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
17. Добавить **150 мкл охлажденного раствора для отмывки 3**. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 200 мкл, не задевая осадка.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-элюента**. Растворить осадок РНК в пробирке, перемешивая элюат на вортексе. В случае высокой вязкости раствора увеличить объем элюента до 100 мкл. Прогреть пробирки в термостате в течение 5-7 мин.
20. Центрифугировать пробирки 2 мин при 10 тыс g. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР. **Раствор РНК хранить при температуре не выше минус 68 °С.**

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