УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 22.07.2011 № 4481-Пр/11

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«11» мая 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus – hMpv),* вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus*-1-4 – *hPiv),* коронавирусов (*human Coronavirus – hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*), ДНК аденовирусов групп B, C и E (*human Adenovirus* B, C, E – *hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus – hBov*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК 11
ВАРИАНТ FRT 13
СОСТАВ 13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК 15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 15
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации 16
А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 16
А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F 17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 23
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 30
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ОРВИ	- Острые респираторные вирусные инфекции
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
РНК	- Рибонуклеиновая кислота
ДНК	- Дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- Комплементарная ДНК получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ПКО	- Положительный контрольный образец
ВКО STI-rec	- Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ОК	- Отрицательный контроль экстракции ДНК/РНК
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
ВК+	- Положительный контроль амплификации образца ВКО STI-rec
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»** предназначен для выявления и идентификации специфических фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus – hMpv),* вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus*-1-4 – *hPiv),* коронавирусов видов OC43, E229, NL63, HKUI (*human Coronavirus – hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*), ДНК аденовирусов групп B, C и E (*human Adenovirus – hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus – hBov*) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы кДНК, полученные из следующего клинического материала: мазков из полости носа и ротоглотки, мокроты (либо аспиратов из трахеи), бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), промывных вод бронхов, секционного материала. Для экстракции ДНК/РНК и

получения кДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Полный анализ включает следующие этапы: экстракция (выделение) ДНК/РНК из образцов клинического материала, обратная транскрипция РНК, ПЦР-амплификация участков геномов микроорганизмов и гибридизационно-флуоресцентная детекция флуоресцентного сигнала, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК/РНК микроорганизмов из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-rec), использование которого позволяет контролировать качество выполнения процедур исследования для каждого образца.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для выделения ДНК/РНК и получения кДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность (при исследовании мазков из полости носа и ротоглотки)

Возбудитель	Комплект для выделения ДНК/РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл [1]
Респираторно-синцитиальный вирус	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$1x10^3$
Метапневмовирус человека	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$1x10^3$
Вирусы парагриппа тип 1-4	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$1x10^3$
Коронавирусы человека	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$1x10^4$
Бокавирус человека	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$1x10^3$
Аденовирусы	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$5x10^3$
Риновирусы	**РИБО-сорб, РИБО-преп,** «NucliSENS easyMAG»	**«ПЦР-комплект»** вариант FRT	$1x10^3$

Аналитическая специфичность

Набор реагентов позволяет обнаружить фрагменты кДНК/ДНК заявленных возбудителей ОРВИ. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании следующих референсных штаммов: респираторно-синцитиальный вирус человека «Лонг» тип А, риновирусы человека (типы 13, 15, 16, 17, 21, 26 и 29), а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением методом секвенирования фрагментов амплификации: респираторно-синцитиальных вирусов типы А и

[1] Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

В, вирусов парагриппа (типы 1-4), коронавирусов человека OC43, E229, NL63, HKUI, аденовирусов человека групп B, C и E; метапневмовирусов человека (типы A и B), бокавируса человека. В реакции на наличие РНК риновирусов возможно выявление близкородственных вариантов энтеровирусов. Реакция по обнаружению аденовирусов не предназначена для типирования (возможно взаимодействие с близкородственными вариантами других типов аденовирусов).

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении кДНК/ДНК других вирусных (вирусы гриппа A и B, коронавирус вызывающий ТОРС (Frankfurt), коронавирусы вызывающие инфекционный перитонит кошек (F1, F2, F5) и гастроэнтерит свиней (ТГС1, ТГС8, ТГС 9), вирусы герпеса, цитомегаловирус, энтеровирусы (типы Echo9, Echo30) и 60 образцов спинномозговой жидкости больных менингитом, содержащих РНК энтеровирусов) и бактериальных возбудителей ОРЗ (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumonia*, *Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Legionella pneumophila*), нормальной микрофлоры полости носа и ротоглотки человека и кДНК/ДНК человека.

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».
- Удалять неиспользованные реактивы 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.
- 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

Сбор материала для анализа:

1. Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (ТУ 9398-083-01897593-2009) – реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки.

Проведение предварительной подготовки материала:

2. МУКОЛИЗИН (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) – реагент для проведения предварительной подготовки мокроты и аспиратов вязкой консистенции.
3. Стерильный физиологический раствор или фосфатный буферный раствор – для предварительной подготовки

секционного материала.

ЗОНА 1. Экстракция ДНК/РНК из клинического материала:

4. Комплект реагентов для выделения – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК/РНК.
6. Автоматическая станция для выделения ДНК/РНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
7. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнитная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции

8. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции –«РЕВЕРТА-L» с реагентом RT-G-mix-1 (ТУ 9398-005-01897593-2008) – вариант 100 или вариант 50.

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

9. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР «Ламинар-С»», «Ламинарные системы», Россия).
10. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
11. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
12. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл и от 200 до 1000 мкл).
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и 1000 мкл в штативах.
14. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл и 0,1 мл.

15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
17. Емкость для сброса наконечников.
18. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или амплификатор планшетного типа (например, iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентные).
19. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – 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.

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- мазки из полости носа и ротоглотки;
- мокрота (либо аспираты из носоглотки и трахеи);
- бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) (либо промывные воды бронхов);
- секционный материал (фрагменты пораженной части легких).

Сбор мазков из полости носа

Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Сбор мазков из ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

ВНИМАНИЕ! При сборе мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды

для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мокрота или аспират из носоглотки или трахеи

Мокроту собирают в стерильные одноразовые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой. Аспираты из носоглотки и трахеи получают традиционным способом и помещают в стерильные одноразовые контейнеры.

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и промывные воды бронхов

Получают традиционным способом и помещают в стерильные одноразовые контейнеры.

Допускается хранение вышеперечисленного 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.

Секционный материал

Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия, либо исследуют в течение 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами и др. материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

Мазки из респираторного тракта. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Мокрота или аспират из носоглотки или трахеи. Работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции ДНК/РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и промывные воды бронхов.

Для выделения используют 100 мкл материала. При необходимости повторного проведения анализа остаток материала замораживают.

Секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации кДНК и идентификации возбудителей ОРВИ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *hRSv – hMpv* раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL *hPiv* 1/3 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL *hPiv* 2/4 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL *hCov* раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL *hAdv – hBov* раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL *hRv* раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	4 пробирки
ПКО кДНК *hRSv – hMpv*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК *hPiv* 1/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК *hPiv* 2/4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК *hRv*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК *hCov*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК *hAdv – hBov*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации для каждой ПЦР-смеси-1-FL, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации кДНК и идентификации возбудителей ОРВИ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL-F *hRSv – hMpv*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F *hPiv* 1/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F *hPiv* 2/4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F *hCov*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F *hAdv – hBov*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F *hRv*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	6 пробирок
ПКО кДНК *hRSv – hMpv*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК *hPiv* 1/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК *hPiv* 2/4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК *hCov*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК *hRv*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО ДНК *hAdv – hBov*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	6 пробирок
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации для каждой ПЦР-смеси-1-FL-F, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	10 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов.
- Обратная транскрипция.
- Проведение амплификации 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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК

Для экстракции ДНК/РНК и проведения реакции обратной транскрипции используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Экстракция ДНК/РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-rec**). Процедура использования рекомендованных наборов реагентов детально описана в Приложениях 1 и 2.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! На этапе амплификации при каждой постановке реакции используются положительные контроли амплификации возбудителей (см. табл. 1), положительный контроль амплификации внутреннего контрольного образца ВК+ (ПКО

STI-88) и отрицательный контроль ПЦР (К-), предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора. Кроме того, на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК (ОК).

Таблица 1

Соответствие наименования ПЦР-смеси-1-FL и положительных контрольных образцов амплификации возбудителей ОРВИ

Наименование ПЦР-смеси-1-FL	Наименование положительных контрольных образцов
hRSv – hMpv	ПКО кДНК *hRSv – hMpv*
hAdv – hBov	ПКО ДНК *hAdv – hBov*
hRv	ПКО кДНК *hRv*
hPiv 1/3	ПКО кДНК *hPiv* 1/3
hPiv 2/4	ПКО кДНК *hPiv* 2/4
hCov	ПКО кДНК *hCov*

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

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

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

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

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL** соответствующего наименования **(см. табл. 1)** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования

ПЦР-смеси-1-FL, см. табл. 1):

а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО (см. табл. 1**).

в) **положительный контроль ПЦР ВКО STI-rec (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.

г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.

5. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки кратким центрифугированием на вортексе (1-2 с) (для приборов планшетного типа).

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесь-1-FL-F** соответствующего наименования **(см. табл. 1)**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL-F, ПЦР-смесью-2-FRT** и **полимеразой (TaqF)** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FL-F** соответствующего наименования **(см. табл. 1)**, **5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT,** и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**. (Расчетная таблица приготовления реакционных смесей в Приложении 3).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл кДНК**, **полученных в реакции обратной транскрипции РНК**.
7. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования **ПЦР-смесь-1-FL-F, см. табл. 1**):

а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку

10 мкл ПКО (см. табл. 1).

в) **положительный контроль ПЦР ВКО STI-rec (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.

г) **отрицательный контроль экстракции (ОК) –** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.

8. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, кратким центрифугированием на вортексе (1-2 с) (для приборов планшетного типа).

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации ОРВИ-Скрин

	Приборы роторного типа[2]			Приборы планшетного типа[3]		
Цикл	Темпера-тура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	**5 мин** (для варианта FRT) **или** **15 мин** (для варианта FRT-100 F)	1	95	**5 мин** (для варианта FRT) **или** **15 мин** (для варианта FRT-100 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с детекция флуо-ресц. Сигнала		54	25 с детекция флуоресц. Сигнала	
	72	10 с		72	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

ВНИМАНИЕ! Не допускается одновременная постановка теста «*Rhinovirus*» с другими тестами набора **«АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»** на приборах **iQ iCycler, iQ5** (Bio-Rad, США).

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля

[2] например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные

[3] например, ДТ-96, iQ5, iCycler iQ или аналогичные

прибора.

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». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК/ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе (см. табл. 3).

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси-1. Для анализа результатов теста «*Rhinovirus*» (*hRv*) необходимо использовать только каналы **FAM** и **ROX**.

Таблица 3

Соответствие наименования ПЦР-смеси-1-FL и каналов детекции возбудителей ОРВИ

Наименование **ПЦР-смеси-1-FL**	Детекция по каналу		
	FAM/Green	JOE/Yellow/HEX	ROX/Orange
hRSv – hMpv	ВКО STI-rec	*hRSv*	*hMpv*
hAdv – hBov	ВКО STI-rec	*hBov*	*hAdv*
hRv	ВКО STI-rec	–	*hRv*
hPiv 1/3	ВКО STI-rec	*hPiv* 3	*hPiv* 1
hPiv 2/4	ВКО STI-rec	*hPiv* 2	*hPiv* 4
hCov	ВКО STI-rec	*NL-63, 229E*	*HKU-1, OC 43*

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК/РНК *возбудителя ОРВИ* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую

линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- ДНК/РНК *возбудителя ОРВИ* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по соответствующему каналу детекции возбудителей ОРВИ (см. табл. 3), и по каналу FAM/Green значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК/РНК.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения Ct указаны в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» и вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК/РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM/Green	JOE/Yellow/HEX	ROX/Orange
		Детекция ВКО STI-rec	Детекция возбудителя ОРВИ	Детекция возбудителя ОРВИ
ОК	Экстракция РНК/ДНК	Меньше порогового значения	Отсутствует	Отсутствует
К-	ПЦР	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
ВК+	ПЦР	Меньше порогового значения	Отсутствует	Отсутствует
К+	ПЦР	Отсутствует	Меньше порогового значения*	Меньше порогового значения

* ПКО кДНК *hRv* не определяется по каналу JOE

ВНИМАНИЕ!

1. Если для К+ значение порогового цикла по каналу(ам) JOE/Yellow/HEX и/или ROX/Orange отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
2. Если для ОК и/или К- значение порогового цикла по каналу детекции возбудителя меньше граничного значения, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК/РНК возбудителя, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Вариант FRT – 9 мес. Вариант FRT-100 F – 12 мес. Набор реагентов
с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F разукомплектовать: ПЦР-смесь-2-FRT, ПЦР-смесь-1-FL-F (объемом 0,2 мл), полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С; остальные реагенты хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смеси-1-FL и ПЦР-смеси-1-FL-F хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»** направлять на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ 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
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — Е.Н.Родионова

Директор ФГБУ «НИИ гриппа»
Минздравсоцразвития России
Руководитель Федерального Центра по гриппу и ОРВИ,
Академик РАМН, д.б.н. — О.И.Киселев

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ПРОБ (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для проведения экстракция ДНК/РНК из образцов)

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»

1. **Лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая ОК). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО STI-rec**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО STI-rec** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с фильтром. Перемешать пипетированием.
   В пробирку ОК внести **100 мкл ОКО**.
4. Плотно закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
5. 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.
6. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость,

используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 8.
10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
12. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтром, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин.

    Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции. Отбирать раствор для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

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

Б. При использовании 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 по **10 мкл ВКО STI-rec** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-rec** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля выделения внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки и 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 **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** 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 **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

14. Поместить пробирки в термостат с температурой **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 с температурой **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге.
17. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.
    Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

В. При использовании автоматической станции «NucliSENS easyMAG»

Вариант 1. Экстракция РНК с лизисом образца вне прибора

Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК/РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **25** mkl, тип образца (*Type*) – Lysed, очередность экстракции РНК в образцах (*priority*) – normal.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК/РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: *On-board Lysis Buffer Dispensing – no*, *On-board Lysis Incubation – no*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая

отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-rec**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объёмом 1,5 мл. После окончания инкубации **(см. п. 8)** следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для экстракции ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-rec**, внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)
7. В пробирку ОК внести **100 мкл ОКО**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку **с магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК/РНК с лизисом образцов вне прибора (*Off board*).
11. После окончания экстракции ДНК/РНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.

    При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после экстракции. Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

Вариант 2. Экстракция РНК с лизисом образца в приборе

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **25** mkl, тип образца (*Type*) – Primary, очередность экстракции РНК в образцах (*Priority*) – normal.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК/РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes*, *On-board Lysis Incubation – Yes*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая ОК). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-rec**.
6. В пробирки с **ВКО** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку ОК внести **100 мкл ОКО**.
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении *Instrument State – Idle*.
10. Ресуспендировать пробирку **с магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора, в каждую пробирку внести отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу экстракции РНК.

12. После окончания экстракции ДНК/РНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.
    При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после экстракции. Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ (проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения амплификации)

ВНИМАНИЕ! Объемы реакционной смеси и РНК отличаются от описанных в стандартной инструкции комплекта реагентов для проведения реакции обратной транскрипции – «РЕВЕРТА-L» с реагентом RT-G-mix-1 (ТУ 9398-005-01897593-2008) – вариант 100 или вариант 50. Для проведения 50 реакций обратной транскрипции требуется 2 комплекта «РЕВЕРТА-L» вариант 50 или 1 комплект «РЕВЕРТА-L» вариант 100. Для проведения 100 реакций обратной транскрипции требуется 2 комплекта «РЕВЕРТА-L» вариант 100.

Общий объем реакции – 40 мкл, объем РНК-пробы – 20 мкл.

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 6 реакций. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **5 мкл RT-G-mix-1** и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMlv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. Внести в пробирки по **20 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечник с фильтром, добавить **20 мкл РНК-пробы** в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) при температуре 37 °С на 30 мин.
7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к **40 мкл кДНК** отдельным наконечником с фильтром добавить **40 мкл ДНК-буфера**, перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с на вортексе для удаления капель с внутренней поверхности крышки

пробирки).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °C в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °C в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10.00	5.00	0.50
Число реакций[5]	ПЦР-смесь-1-FL, мкл	ПЦР-смесь-2-FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
6	60	30	3.0
8	80	40	4.0
10	100	50	5.0
12	120	60	6.0
14	140	70	7.0
16	160	80	8.0
18	180	90	9.0
20	200	100	10.0
22	220	110	11.0
24	240	120	12.0
26	260	130	13.0
28	280	140	14.0
30	300	150	15.0
32	320	160	16.0

[5] Число исследуемых образцов, включая контроль этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+3+1).