

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 12.07.2013 № 3138-Пр/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«21» декабря 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

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

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени».....	14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, гомогенатов тканей мозга и внутренних органов, комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- Внутренний контрольный образец
В-	- Отрицательный контроль экстракции
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
кДНК	- Комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- Нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
DV	- <i>Dengue virus</i> , вирус денге
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК DV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию РНК из образцов биологического материала, проведение обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК DV с 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-rec), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными

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

пробами проводятся обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификация участков кДНК DV 1-4 типов при помощи специфичных к данным участкам кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых кДНК-мишеней, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

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

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

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

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

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с 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! Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

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

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
2. Гомогенизатор TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации аутопсийного материала и комаров.
3. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм.
4. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в

- зависимости от типа исследуемого биоматериала) – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «МАГНО-сорб» (ТУ 9398-106-01897593-12) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 1.
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
 6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
 7. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
 9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах (например, Axugen, США).
 10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
 11. Одноразовые пролипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
 12. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл.
 13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб РНК.
 14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 15. Емкость для сброса наконечников.
 16. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
 17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой – при использовании прибора планшетного типа;

- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, 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, 2010 г.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Плазма крови, сыворотка крови

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

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

Аутопсийный материал (ткани мозга и внутренних органов)

Данный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации тканей внутренних органов: объем PBS-буфера или 0,15 М раствора NaCl для гомогенизации определяется объемом гомогенизируемой ткани

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

Комары

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

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

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

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

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

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

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

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

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

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

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

ФОРМАТ FRT

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

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

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

К комплекту реагентов прилагаются следующие реагенты:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Обратная транскрипция и амплификация с 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 и дифференциации РНК вируса денге (*Dengue virus, DV*) 1-4

типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Dengue virus type-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов:

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

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

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

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

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

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций – смешать в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT DV**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, полимеразу (**TaqF**), **ТМ-Ревертазу (MMIv)** и **RT-G-mix-2**, из расчета на каждую реакцию:
 - **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT DV**;
 - **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**;
 - **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**;
 - **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**;
 - **0,25 мкл RT-G-mix-2**.

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

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

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить.

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – внести в пробирку **10 мкл K–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (K+)** – внести в пробирку **10 мкл K+ DV 1-4 типов /STI**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (B–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы «**B–**», полученной на этапе экстракции РНК.

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

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения

соответствующей программы обратной транскрипции, амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл.1).

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного типа ⁴			Приборы планшетного типа ⁵		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	5	95	10 с	5
	56	35 с		56	40 с	
	72	15 с		72	20 с	
4	95	10 с	40	95	10 с	40
	54	35 с детекция флуоресц. сигнала		54	40 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	20 с	

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

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

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

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

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

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

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Соответствие мишеней и каналов детекции

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК DV соответствующего типа **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК DV любого типа **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора

Су5.5 определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение, а по соответствующим типу *DV* каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Су5 значение порогового цикла не определено или больше указанного.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора FAM, JOE, ROX, Су5 и по каналу для флуорофора Су5.5 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 и дифференциации РНК вируса денге (*Dengue virus, DV*) 1-4 типов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Dengue virus type-FL*», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i> по каналу для флуорофора				
		FAM	JOE	ROX	Sy5	Sy5.5
B-	Экстракция РНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Sy5 отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК по данному каналу.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (B-) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Sy5 определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на данном канале или каналах.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (K-) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Sy5, Sy5.5 определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на каком-либо из каналов с постановкой K- не менее чем в трех повторах.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® **Dengue virus type-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Л. Никонов

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, гомогенатов тканей мозга и внутренних органов, комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками, включая отрицательный контроль экстракции (В–). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-рес**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-рес** для исследуемых проб внести по **30 мкл** исследуемых суспензий гомогенатов тканей мозга или внутренних органов, или по **100 (возможно 200) мкл** плазмы (или сыворотки), или по **100 мкл** суспензий комаров.
4. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) вносятся 10 мкл ВКО STI-87-рес и 300 мкл раствора для лизиса.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
6. Процентрифугировать пробирки в течение **5 с** при **1500 g** для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
8. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **10 000 g**.
9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. 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.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		