



Инструкция по применению набора реagens расположена на сайте [www.pcr.ru](http://www.pcr.ru) или [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru)



## Краткое руководство

### набор реagens для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Yellow fever virus-FL*

Форма 2:  
«ПЦР-комплект» вариант FRT-L



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



REF H-2462-1-4 / VER 04.12.17

#### **ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

##### **Рекомендуемые комплекты:**

- «РИБО-преп» для экстракции РНК из плазмы крови, крови, слюны, мочи, тканевого (аутопсийный, биопсийный) материала, комаров;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК из мочи и плазмы крови,

**Контроли:** Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

<b>Объем исследуемого образца, контролей и элюции</b>		
<b>При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:</b>		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку на дно
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для <b>ОК</b> (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПК О YFV	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b> (положительного контроля экстракции)
<b>Элюция</b>		
все образцы	100 мкл	в каждую пробирку
<b>При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» из 200 мкл образца добавить:</b>		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку на дно
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	200 мкл	в пробирку для <b>ОК</b> (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПК О YFV	190 мкл + 10 мкл	в пробирку для <b>ПК</b> (положительного контроля экстракции)
<b>Элюция</b>		
все образцы	100 мкл	в каждую пробирку

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» из 1000 мкл образца добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку на дно
Исследуемые образцы	1000 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	1000 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПКО YFV	990 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
<b>Элюция</b>		
все образцы	100 мкл	в каждую пробирку

**ВНИМАНИЕ!** Реакцию ОТ-ПЦР рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели и при температуре не выше минус 68 °С до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

#### **ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

**Общий объем реакционной смеси:** 25 мкл, включая объем пробы РНК (25 мкл).

**Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью YFV-Lyo** для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных проб.

Внести по 25 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, <b>ОК, ПК</b> <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избежать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы РНК, экстрагированной из ОК	
Пробы РНК, экстрагированной из ПК	
К+ YFV	в пробирку для <b>К+</b>
К-	в пробирку для <b>К-</b>

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

**ВНИМАНИЕ!** Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы для приборов роторного типа<sup>1</sup> и планшетного типа<sup>2</sup>.

**ВНИМАНИЕ!** С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	<b>FAM, JOE</b>	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

3. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** При неполной загрузке приборов планшетного типа установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

4. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

#### **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

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

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Yellow fever virus</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла (Ct).

**ВНИМАНИЕ!** К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения Ct, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

<sup>1</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

<sup>2</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.