УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 14.08.2009 № 6509-Пр/09

«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
«19» июля 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Rubella virus*-FL»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оглавление

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ. 3
СОСТАВ. 3
НАЗНАЧЕНИЕ. 4
ПРИНЦИП МЕТОДА. 5
ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ. 6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ. 7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА. 8
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА. 9
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПРОБ. 10
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ. 13
АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ. 14
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ. 16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ. 16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 16

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.
Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F;

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **3** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) или в случае выделения РНК при помощи автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» (производства «bioMérieux», Франция).

СОСТАВ.

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

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

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

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК *Rubella virus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	***Описание***	***Объем (мл)***	***Кол-во***
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Rubella virus*	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 (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК *Rubella virus* и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

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

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	***Описание***	***Объем (мл)***	***Кол-во***
ОКО	Прозрачная жидкость соломенно-жёлтого цвета	0,5	2 пробирки
ПКО *Rubella virus*-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов **«АмплиСенс®** ***Rubella virus*-FL»** предназначен для выявления РНК вируса краснухи (*Rubella virus*), выделенной из клинического материала (РНК из плазмы периферической и пуповинной крови; слюны; мазков из ротоглотки; амниотической жидкости) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение РНК из клинического материала, проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» (производства ФГУН ЦНИИЭ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Роспотребнадзора) или автоматическую станцию «NucliSENS® easyMAG™» (производства «bioMérieux», Франция) для выделения РНК из клинического материала.

Аналитическая чувствительность.

Набор реагентов позволяет выявлять РНК *Rubella virus* с аналитической чувствительностью 400 копий/мл при использовании **рекомендованных** методов выделения РНК.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод выявления РНК вируса краснухи в клиническом материале, основан на выделении тотальной РНК из клинического материала совместно с внутренним контрольным образцом, проведении реакции обратной транскрипции РНК, проведении реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме «реального времени».

Выделение РНК проводить только с внутренним контролем ПЦР-анализа, т.е. в каждый исследуемый или контрольный образец необходимо добавлять **ВКО STI-87-rec.**

Вирус краснухи относится к роду *Rubivirus* семейства *Togaviridae* и является единственным тогавирусом. Передача вируса происходит воздушно-капельным, контактно-бытовым (через инфицированные предметы) или трансплацентарным путем. Вирус размножается и накапливается в области ворот инфекции (слизистые оболочки дыхательных путей), где его можно обнаружить за несколько дней до появления сыпи и в течение 5-7 дней после. Спустя несколько дней наступает период виремии после размножения и накопления вируса в региональных лимфатических узлах (затылочных и заднешейных). Разносится инфекция с кровью по всему организму и проявляет тропность к дерме, лимфоидной и эмбриональной ткани. С появлением сыпи вирус в крови не обнаруживается, хотя в слюне и смывах из носоглотки может продолжать выделяться до 1 нед после появления экзантемы.

Краснуха – острая инфекция, проявляющаяся кратковременной лихорадкой, мелкопятнистой экзантемой, генерализованной лимфаденопатией и поражением плода у беременных. Источником и резервуаром инфекции служит человек в период за 1 нед до появления высыпаний и 5-7 дней после. Вирус обнаруживается в крови, слюне, мазках из зева и носоглотки инфицированного. Наибольших значений концентрация вируса в крови достигает примерно через 10-14 дней с момента инфицирования и до появления клинических признаков. В этот период инфицированность пациента вирусом краснухи можно определить исключительно прямыми методами диагностики, так как этот этап представляет собой период «серологического окна», во время которого факт инфицирования серологическими методами диагностики подтвердить нельзя. Впоследствии, вирус элиминирует из крови и обнаруживается в мазках и смывах из ротоглотки в течение 5-7 дней с момента появления сыпи.

Вирус краснухи обладает тератогенным действием и, проникая через плаценту, может инфицировать эмбриональные клетки, что приводит к патологии развития, смерти плода,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

мертворождениям или самопроизвольному родоразрешению. Наиболее опасно инфицирование в первый триместр беременности, в этот период вероятность поражения плода составляет 75-90 %. Установление факта инфицирования плода осуществляется методом ОТ-ПЦР, при этом выбор материала следует делать с учетом срока гестации: до 22 недели – ворсинки хориона (12-14 недели), амниотическая жидкость (16-18 недели); после 22 недели – пуповинная кровь, плацента. В случае врожденной краснухи у детей вирус может выделяться из организма в течение первых 1-2 лет после рождения.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

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

Для проведения анализа используют следующий материал:

Плазма периферической и пуповинной крови.

Взятие крови производят натощак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА**)**. После взятия крови пробирку плавно несколько раз переворачивают вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. После плавного перемешивания пробирку помещают в штатив.

Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600 g (3 тыс об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 2,0 мл.

Хранить плазму можно не более 5 сут для качественного определения ДНК/РНК и не более одних суток для количественного определения ДНК/РНК инфекционных объектов при температуре от 2 до 8 °С; не более года – при температуре не выше минус 16 °С и длительно - при температуре не выше минус 68 °С. Необходимо помнить, что при каждом размораживании образца происходит частичное разрушение вируса и деградация вирусной РНК, поэтому для длительного хранения образец рекомендуется делить на небольшие аликвоты по 0,2 – 0,5 мл.

Слюна.

Слюну собирают в стерильную пробирку типа «Эппендорф» на 1,5 мл в количестве 0,2-1,0 мл после трехкратного полоскания рта кипяченой водой.

Допускается хранение материала при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут и при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Смывы и мазки из ротоглотки.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную пробирку типа «Эппендорф» с 500 мкл транспортной среды. Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Допускается хранение материала при температуре от 2 до 8 °С не более 1 сут, при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 мес и при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Амниотическая жидкость.

Взятие амниотической жидкости производится в стерильную пробирку типа «Эппендорф» – при проведении амниоцентеза согласно стандартной методике.

Для проведения исследования необходимо провести предобработку анализируемого материала. Образец амниотической жидкости тщательно ресуспендировать. Автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, отобрать 1 мл материала и перенести в новую стерильную пробирку типа «Эппендорф» для проведения центрифугирования при 8-9 тыс g (12-13 тыс об/мин в центрифуге на 12 мест) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отобрать, используя наконечник с аэрозольным барьером, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, затем ресуспендировать материал на вортексе.

Допускается хранение амниотической жидкости и предобработанного материала в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес - при температуре не выше минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать следующие комплекты реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора:

– **«РИБО-преп», «РИБО-сорб»** – для плазмы периферической и пуповинной крови, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, амниотической жидкости.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. **Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.**
2. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером.
3. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
6. Поверхности столов, а также помещения до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения РНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
5. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп»:

1. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axygen», США).

При использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™»:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК «NucliSENS® easyMAG™» (поставщик «ИнтерЛабСервис», Россия).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) («bioMérieux», Франция).

ЗОНА 2.

Для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, а также гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

1. Амплификатор «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ5», «iQ iCycler» («BioRad», США) и «Mx3000P»/«Mx3005P» («Stratagene», США) или эквивалентный.
2. Для приборов с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»): одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Axygen», США) для постановки в ротор на 36 пробирок или 0,1 мл («Corbett Research», Австралия) для постановки в ротор на 72 пробирки.

   Для приборов с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»): одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Axygen», США).
3. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 и 200 мкл (например, «Axygen», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ПЦР-анализ состоит из двух этапов – выделения РНК и проведения ОТ-ПЦР, каждый из этапов контролируется с помощью предназначенных для этого контрольных образцов:

На этапе выделения РНК используются **ПКО *Rubella virus*-rec, ВКО STI-87-rec, ОКО**.

На этапе ОТ-ПЦР используются положительные контроли: **ПКО кДНК *Rubella virus*** и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПКО STI которые предназначены для контроля правильности измерения значений на канале **Yellow/JOE/HEX (ПКО кДНК *Rubella virus***) и на канале **Green/FAM (ПКО STI)**; **РНК-буфер,** который предназначен для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы лаборанта.

В каждом эксперименте, независимо от количества исследуемых клинических образцов, добавляется два контрольных образца (отрицательный и положительный) – на этапе выделения РНК, и два контрольных образца – на этапе ОТ-ПЦР.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПРОБ.
(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).
Объем пробы, необходимый для выделения РНК, – 0,1 мл.

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

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб».

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор** и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО STI 87-rec.** Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО STI 87-rec** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО *Rubella virus*-rec.**
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть 10 мин при температуре 60 °С в термостате.
5. 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.
6. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента.** Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
7. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3.** Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Проценрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
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 при температуре 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 аэрозольным барьером. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °С на 5 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.

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

Очищенная РНК может храниться до 8 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 месяца при температуре не выше минус 16 °С, 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 выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI 87-rec**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО *Rubella virus*-rec**. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.

4. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
5. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**
6. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
7. 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.
8. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
9. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
10. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
11. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
13. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 2-5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
14. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
15. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР. Очищенная РНК может храниться до 8 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™».

При использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» совместно с набором реагентов возможно использование протоколов, позволяющих проводить выделение ДНК из объемов образцов от 0,1 мл до 1 мл.

Процедура выделения проводится в соответствие с инструкцией к автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™». Допускается использование режимов лизиса на борту прибора («On-board») и вне прибора («Off-board»). Программируемый объем элюции – 55 мкл.

После окончания выделения ДНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения ДНК провести реакцию ПЦР-амплификации.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Порядок работы также см. Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления и количественного определения РНК *Rubella virus* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Rubella virus*-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ-2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем РНК-пробы - 10 мкл.

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

Порядок работы

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице (см. приложение 1). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца РНК необходимо проводить постановку двух контролей этапа ОТ-ПЦР.** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования реагентов.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов РНК и кДНК. Тип пробирок, стрипов или планшетов выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
3. В пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл РНК-проб** выделенных из клинических или контрольных образцов.
4. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
   а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
   б) положительный контроль ПЦР – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Rubella virus* и STI.**

Проведение амплификации.

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Программа амплификации «АмплиСенс-2» для приборов роторного типа[1]

Этап	*Температура, °С*	*Продолжительность этапа*	*Измерение флуоресценции*	*Количество циклов*
Hold/Удерж. темп-ры	50	15 мин	–	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

Программа амплификации «АмплиСенс-2» для приборов планшетного типа[2]

Этап	*Температура, °С*	*Продолжительность этапа*	*Измерение флуоресценции*	*Количество циклов*
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	–	

Примечание - Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультиплекс», для которых используются эти каналы.

3. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». По каналу – **FAM/Green** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **кДНК STI-87-rec (ВКО)**, по каналу **JOE/Yellow/HEX** – **кДНК *Rubella virus* (ПКО).** Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов (см. описание для данного прибора). Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в

[1] Например, RotorGene 3000 и RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)
[2] Например, iQiCycler, iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

реальном времени S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции *(см. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в реальном времени и методические рекомендации по применению набора реагентов* для выявления РНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Rubella virus*-FL»).

1. **Образец считается положительным**, если в таблице результатов по каналу JOE/Yellow/HEX для него определено значение порогового цикла «Ct», не превышающее значение, указанное во вкладыше к набору реагентов, а в таблице результатов по каналу FAM/Green значение порогового цикла «Ct» не превышает значений, приводимых для ВКО.
2. **Образец считается отрицательным**, если в таблице результатов по каналу JOE/Yellow/HEX для него не определено значение порогового цикла «Ct» (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу FAM/Green значение порогового цикла «Ct» не превышает значений, приводимых для ВКО.

Возможные ошибки.

1. Если в положительном контроле выделения РНК (**ПКО *Rubella virus*-rec)** отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки при выделении РНК. Необходимо провести выделение еще раз.
2. Если в положительном контроле ОТ-ПЦР (**ПКО кДНК *Rubella virus* и STI**) отсутствует положительный сигнал. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ОТ-ПЦР (например, неправильно выбранная программа амплификации). Необходимо провести ОТ-ПЦР еще раз.
3. Если для данного образца не определено значение порогового цикла «Ct» или выше диапазона, заданного во вкладыше значения по каналу **JOE/Yellow/HEX**, а по каналу **FAM/Green** получено значение «Ct» превышающее максимальное значение, приводимое для ВКО. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере РНК или наличие ингибиторов ОТ-ПЦР.
4. Если в отрицательном контроле выделения по каналу **JOE/Yellow/HEX**, а в отрицательном контроле ОТ-ПЦР по каналу **JOE/Yellow/HEX** и **FAM/Green** детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
5. Клинические образцы, в которых появились значения «Ct» по каналу JOE/Yellow/HEX (*Rubella virus*) не превышающие превышающее максимальное значение, приводимое во вкладыше, считаются положительными. Если значение «Ct» в пробе превышает этот

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

порог, то результат считается сомнительным, необходимо провести дополнительное исследование данного образца РНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения «Ct» – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 9 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. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» (кроме RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *Rubella virus*, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF) и ТМ-ревертазы (MMlv)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Rubella virus*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF) и ТМ-ревертазу (MMlv) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *Rubella virus*-FL»** направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), адрес предприятия-изготовителя – ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. группы контроля качества (ГКК) (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru), в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний — Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		**10.00**	**5.00**	**0.25**	**0.50**	**0.25**
Число исследуемых образцов[3]	**Число реакций**[4]	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Rubella virus***	**ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**	**RT-G-mix-2**	**Полимераза (TaqF)**	**ТМ-Ревертаза (MMlv)**
3	**6**	**60**	**30**	**1.5**	**3.0**	**1.5**
5	**8**	**80**	**40**	**2.0**	**4.0**	**2.0**
7	**10**	**100**	**50**	**2.5**	**5.0**	**2.5**
9	**12**	**120**	**60**	**3.0**	**6.0**	**3.0**
11	**14**	**140**	**70**	**3.5**	**7.0**	**3.5**
13	**16**	**160**	**80**	**4.0**	**8.0**	**4.0**
15	**18**	**180**	**90**	**4.5**	**9.0**	**4.5**
17	**20**	**200**	**100**	**5.0**	**10.0**	**5.0**
19	**22**	**220**	**110**	**5.5**	**11.0**	**5.5**
21	**24**	**240**	**120**	**6.0**	**12.0**	**6.0**
23	**26**	**260**	**130**	**6.5**	**13.0**	**6.5**
25	**28**	**280**	**140**	**7.0**	**14.0**	**7.0**
27	**30**	**300**	**150**	**7.5**	**15.0**	**7.5**
29	**32**	**320**	**160**	**8.0**	**16.0**	**8.0**
31	**34**	**340**	**170**	**8.5**	**17.0**	**8.5**
33	**36**	**360**	**180**	**9.0**	**18.0**	**9.0**
35	**38**	**380**	**190**	**9.5**	**19.0**	**9.5**
37	**40**	**400**	**200**	**10.0**	**20.0**	**10.0**
39	**42**	**420**	**210**	**10.5**	**21.0**	**10.5**
41	**44**	**440**	**220**	**11.0**	**22.0**	**11.0**
43	**46**	**460**	**230**	**11.5**	**23.0**	**11.5**
45	**48**	**480**	**240**	**12.0**	**24.0**	**12.0**
47	**50**	**500**	**250**	**12.5**	**25.0**	**12.5**
49	**52**	**520**	**260**	**13.0**	**26.0**	**13.0**
51	**54**	**540**	**270**	**13.5**	**27.0**	**13.5**
53	**56**	**560**	**280**	**14.0**	**28.0**	**14.0**
55	**58**	**580**	**290**	**14.5**	**29.0**	**14.5**
57	**60**	**600**	**300**	**15.0**	**30.0**	**15.0**

[3] число клинических образцов и контроли этапа выделения РНК (N+2)

[4] число клинических образцов, контроли этапа выделения РНК и контроли этапа ОТ-ПЦР (N+2+3)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru