

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 04.05.2012 № 2084-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И.Покровский

«15» апреля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса Западного Нила
в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] WNV-FL»

АмплиСенс[®]



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	9
ФОРМАТ FRT	13
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка пробирок для амплификации	16
Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»	18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, СМЖ, лейкоцитарной фракции крови, мочи (без осадка солей), гомогенатов тканей внутренних органов и комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп» .	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп»	25
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб»	28
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контрольный образец экстракции РНК
ПК	-положительный контроль экстракции РНК
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СМЖ	- спинномозговая жидкость
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
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
WNV	- <i>West Nile virus</i> , вирус Западного Нила

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *WNV-FL*» предназначен для выявления РНК вируса Западного Нила (*WNV*) в клиническом (плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча) и аутопсийном материале от людей (ткани мозга, печени, селезенки, лимфоузлов), материале от животных (ткани мозга), в комарах и клещах методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *WNV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракцию РНК из образцов клинического материала, проведение обратной транскрипции РНК и амплификацию участка кДНК *WNV* с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

Экстракция РНК из клинического материала проводится в

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

присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводятся: обратная транскрипции РНК с помощью фермента ТМ-Ревертазы и амплификация участков кДНК *WNV* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает комплекты реагентов для комбинированного метода экстракции РНК: «РИБО-преп» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов для комбинированного метода экстракции РНК: «РИБО-сорб» вариант 50, «РИБО-золь-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает 1 комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000, 2 комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 6 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в зависимости от вида исследуемого материала.

Формы комплектации 2, 3, 4, 5 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая экстракцию РНК из клинического материала, проведение обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 6 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/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Пробоподготовка материала
сыворотка крови (200 мкл), СМЖ (200 мкл), лейкоцитарная фракция крови (200 мкл), 10 % суспензия тканей мозга (30 мкл), комары (100 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^3	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки и биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы
лейкоцитарная фракция крови (200 мкл), 10 % суспензия тканей мозга (30 мкл), комары (100 мкл)	«РИБО-преп» и «РИБО-золь-С»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^3	
лейкоцитарная фракция крови (200 мкл), 10 % суспензия тканей мозга (30 мкл), комары (100 мкл)	«РИБО-сорб» и «РИБО-золь-С»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^3	
Сыворотка и плазма крови, СМЖ – 1 мл	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^2	

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах (вирус клещевого энцефалита, Лангат, Повассан, Японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки);
- герпесвирусах (I и II типов, CMV, EBV, VZV, IV типа), энтеровирусах (ECHO, Coxsackie);
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii* ssp. *caspia*, *R.heilongjiangensis*; *Coxiella burnetii*; *Bartonella henselae*, *B.quintana*);
- спирохетах (*Borrelia miyamotoi*; *Treponema pallidum*; *Leptospira interrogans*, *L.kirshneri*, *L.borgpetersenii*).

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека, ДНК птиц, ДНК клещей и 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».

ВНИМАНИЕ! При работе с клещом с высокой степенью питанности рекомендуется перед гомогенизацией проколоть его одноразовой иглой для выхода крови и предупреждения разбрызгивания материала при растирании в ступке.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого биоматериала) при работе с формой комплектации 1.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.

4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации аутопсийного материала, клещей и комаров.
5. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм.
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
7. Центрифуга/вортекс.
8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах, до 200 мкл и до 1000 мкл.
10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся 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 ДНК.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.
16. Емкость с дезинфицирующим раствором.
17. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
18. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора роторного типа.

При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» дополнительно:

1. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм от 25 до 100 °С.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Магнитный штатив для пробирок на 5 мл, диаметр 12 мм.
5. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом до 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные.
6. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом до 5 мл диаметром 12 мм.
7. Автоматический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл.
8. Одноразовые наконечники до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

1. Плазма крови, сыворотка крови, СМЖ. 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. Сыворотку крови получают стандартными методами. СМЖ не проходит стадию пробоподготовки. Для исследования отбирают 200 мкл клинического материала при экстракции РНК с использованием комплекта «РИБО-преп» или 1 мл клинического материала при использовании комплекта «МАГНО-сорб».
2. Лейкоцитарная фракция крови. Для исследования

лейкоцитарной фракции крови (данный тип клинического материала рекомендуется для исследования на 2-й нед заболевания) 1,5 мл крови с раствором ЭДТА переносят в пробирку типа «Эппендорф» и центрифугируют на микроцентрифуге при 400 g в течение 10 мин. Затем отбирают приблизительно 500-600 мкл плазмы и центрифугируют при 7000 g в течение 10 мин. После чего оставляют для экстракции РНК осадок клеток и 200 мкл надосадочной плазмы над клетками при экстракции с использованием комплекта «РИБО-преп» и при использовании комбинированных методов экстракции (комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб» или комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп»).

3. Внутренние органы животных и секционный материал.

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/сек; время гомогенизации – 2-3 минуты; для тканей печени, селезенки, лимфоузлов: диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/сек; время гомогенизации – 10 минут; для лимфоузлов: диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/сек; время гомогенизации – 5 минут.

Для экстракции РНК берут 30 мкл суспензии в случае экстракции комплектом «РИБО-преп» и комбинированным методом (комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб») и 100 мкл суспензии в случае экстракции комбинированным методом (комплекты «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп»).

4. Моча. Для исследования моча собирается в чистую посуду. Если нет возможности исследовать материал в течение

1 суток после взятия, моча переносится в центрифужную пробирку на 30 мл или пробирку типа «Эппендорф», затем в нее вносят глицерин, 10 % от объема пробы, перемешивают для равномерного распределения глицерина и замораживают при минус 20 °С для хранения в течение 1 нед или при минус 70 °С в течение более длительного времени.

При наличии центрифуги с охлаждением до 4 °С для пробирок объемом 30 мл и ускорением 8000 g используется следующий алгоритм пробоподготовки. Пробу центрифугируют при 8000-9000 g в течение 10 мин, затем надосадочную жидкость переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 1 мл надосадочной жидкости над ним – в пробирку типа «Эппендорф». После чего снова концентрируют пробу при 8000 g в течение 10 мин. 900 мкл надосадочной жидкости переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК. В случае наличия большого количества солей, для экстракции РНК в отдельную пробирку типа «Эппендорф» переносят 100 мкл надосадочной жидкости.

При отсутствии центрифуги для пробирок объемом 30 мл и ускорением 8000 g, проводят концентрирование бактерий только из 1 мл мочи как описано выше. Экстракцию РНК также проводят из осадка и 100 мкл надосадочной жидкости.

5. 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 – 700 мкл (пул из 25 комаров), 1000-1500 мкл (пул из 50 комаров). Предварительно формируют пулы комаров (не более 50 особей). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 30 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.
6. Клещи. Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полунапитавшихся – по 2-3;

полностью напитавшихся – по 1. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации клещей рода *Hyalomma* (диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 10-12 мин; объем буфера – 700 мкл (ненапитавшийся клещ), 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей). В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растирают в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща) или в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин и отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Допускается хранение вышеперечисленного клинического материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Для аутопсийного материала и насекомых предусмотрены следующие режимы хранения: ткани внутренних органов и комаров хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре минус 70 °С. Клещей хранят или живыми (до 1 мес) или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре минус 70 °С.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ²	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	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. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «РИБО-золь-С» вариант 50 (ТУ 9398-074-01897593-2008) – комплект реагентов для первого этапа выделения РНК из биологического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем,</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор E	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
Раствор A	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	15	1 флакон
Раствор B	Прозрачная бесцветная жидкость	5	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3, 4.

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

² 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.

ФОРМАТ FRT

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 2, 3.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000 (ТУ 9398-106-01897593-12) – 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 ⁵	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 выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл. Входит в состав формы комплектации 5.

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

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

ФОРМАТ FRT

<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 WNV	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
ПКО кДНК WNV / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли. 1 комплект реагентов входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 4. 2 комплекта реагентов входят в состав формы комплектации 5.

К комплекту реагентов прилагаются следующие реагенты:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	8 пробирок
ПКО WNV-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	5 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.
- Проведение обратной транскрипции и амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] WNV-FL»,

разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

- **«РИБО-преп»** – экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, СМЖ, лейкоцитарной фракции крови, гомогенатов тканей внутренних органов и комаров, осадков мочи, содержащих только эпителиальные клетки и не содержащих соли;
- **«РИБО-золь-С»** – экстракция РНК на первом этапе выделения из лейкоцитарной фракции крови, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей, осадков мочи (в том числе содержащих соли). Второй этап выделения проводится с использованием комплекта **«РИБО-преп»** или **«РИБО-сорб»**;
- **«МАГНО-сорб»** – экстракция РНК из 1 мл плазмы и сыворотки крови, СМЖ.

При использовании формы комплектации 2 экстракция РНК проводится с помощью комплекта **«РИБО-преп»** в соответствии с Приложением 1. При использовании формы комплектации 3 экстракция РНК проводится с помощью комплектов **«РИБО-золь-С»** и **«РИБО-преп»** в соответствии с Приложением 2. При использовании формы комплектации 4 экстракция РНК проводится с помощью комплектов **«РИБО-золь-С»** и **«РИБО-сорб»** в соответствии с Приложением 3. При использовании формы комплектации 5 экстракция РНК проводится с помощью комплекта **«МАГНО-сорб»** в соответствии с инструкцией к набору.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

режиме «реального времени».

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

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

Способы внесения реактивов в пробирки:

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

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум четырех контрольных образцов: положительного контроля экстракции (ПК), отрицательного контроля экстракции (ОК), положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+ и К-).

2. Раскапать приготовленные смеси в пробирки по **15 мкл**.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить.

3. Используя наконечник с фильтром, добавить **10 мкл РНК-пробы** в пробирки с каждой реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.

4. Для каждой панели исследуемых образцов необходимо поставить контроль амплификации кДНК:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
- б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК WNV/STI**.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы 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 (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	5 с	5	95	5 с	5
	56	25 с		56	30 с	
	72	15 с		72	15 с	
4	95	5 с	40	95	5 с	40
	56	25 с детекция флуоресц. сигнала		56	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

⁴ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

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

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Соответствие мишеней и каналов детекции

ПЦР-смесь-1	Детекция по каналу	
	FAM/Green	JOE/Yellow
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT <i>WNV</i>	ВКО	<i>WNV</i>

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *WNV* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное во вкладыше. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК *WNV* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение, а по каналу JOE значение порогового цикла не определено или больше указанного во вкладыше.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE, и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование

соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® WNV-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 3).

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
2. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить экстракцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

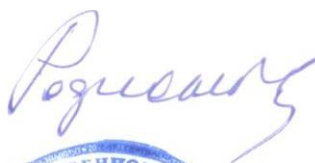
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® WNV-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)⁶.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ



Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»



Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

⁶ 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, СМЖ, лейкоцитарной фракции крови, мочи (без осадка солей), гомогенатов тканей внутренних органов и комаров с применением комплекта реагентов «РИБО-преп» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

Порядок работы

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. В случае экстракции РНК из **гомогенатов тканей, плазмы, сыворотки, СМЖ и гомогенатов комаров** 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-87-rec**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО STI-87-rec** внести по **30 мкл** исследуемых суспензий органов, по **100 мкл** суспензий комаров, по **200 мкл** плазмы, сыворотки, СМЖ.
4. При экстракции из **лейкоцитарной фракции крови** или **осадка мочи** в данные исследуемые пробирки необходимо внести **300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО STI-87-rec**. Затем отобрать две пробирки для отрицательного и положительного контролей экстракции.
5. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции и положительного контроля (ПК) экстракции внести **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести также **10 мкл ПКО WNV-rec**.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
7. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 г**.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
17. Центрифугировать пробирки при **10 000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

Порядок работы

I этап

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-rec**, затем добавить по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В случае изоляции РНК из суспензий клещей, комаров, внутренних органов в пробирки с раствором D и ВКО STI-87-rec добавляются по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром.
3. При экстракции РНК из лейкоцитарной фракции крови или осадков мочи в пробирки с осадками вносят по **300 мкл раствора D** и по **10 мкл ВКО STI-87-rec**.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОК** и **10 мкл ВКО STI-87-rec**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **10 мкл ПК** *WNV-rec*, **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **90 мкл ОК**. Плотное закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе.
5. Прогреть пробирки в термостате при 56 °С в течение 5 мин, периодически встряхивая их на вортексе.
6. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
7. В эти же пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
8. В эти же пробирки внести **100 мкл раствора B**, перемешать на вортексе в течение 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °С) на 5 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 10 000 g.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

9. В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **300 мкл раствора для лизиса (из комплекта реагентов «РИБО-преп»)** и промаркировать соответственно номерам проб.
10. После центрифугирования раствор долженделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно, не захватывая нижний слой, отобрать **200 мкл** верхней фазы и перенести ее в пробирку с раствором для лизиса. Тщательно перемешать смесь.

II этап

11. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Процентрифугировать в течение **5 с при 1500 g** для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
13. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. 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.
15. Процентрифугировать при **10 000 g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
16. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
17. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
18. Процентрифугировать при **10 000 g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
19. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

наконечник для каждой пробы.

20. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
21. 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.
22. Центрифугировать пробирки при **10 000 g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция РНК из лейкоцитарной фракции крови, осадков мочи, суспензий тканей внутренних органов, комаров и клещей с применением комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб» (проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

Порядок работы.

I этап

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-рес**, затем добавить по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В случае изоляции РНК из суспензий клещей, комаров в пробирки с раствором D и ВКО STI-87-рес добавляются по **100 мкл подготовленных проб**, в случае изоляции из суспензий тканей внутренних органов – **30 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром.
3. При экстракции РНК из лейкоцитарной фракции крови или осадков мочи в пробирки с осадками вносят по **300 мкл раствора D** и по **10 мкл ВКО STI-87-рес**.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО** и **10 мкл ВКО STI-87-рес**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **10 мкл ПКО WNV-рес**, **10 мкл ВКО STI-87-рес** и **90 мкл ОКО**. Плотнo закрытые пробы тщательно перемешать на вортeксе и центрифугировать в течение 5 с при 1500 g на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
5. Прогреть пробирки в термостате при 56 °С в течение 5 мин, периодически встряхивая их на вортeксе.
6. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортeксе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
7. В эти же пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортeксе и центрифугировать 5 с при 1500 g.
8. В эти же пробирки внести **100 мкл раствора B**, перемешать на вортeксе в течение 1-2 мин (раствор должен стать

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

- молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °С) на 5 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 10 000 g.
9. В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **400 мкл лизирующего раствора (из комплекта реагентов «РИБО-сорб»)** и промаркировать соответственно номерам проб.
 10. После центрифугирования раствор долженделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно, не захватывая нижний слой, отобрать верхнюю фазу (**400 мкл при экстракции РНК из осадков мочи и гомогенатов внутренних органов, гомогенатов комаров и клещей, 300 мкл – из осадков крови, 450 мкл при экстракции РНК из ОКО и ПКО**) и перенести ее в пробирку с лизирующим раствором. Тщательно перемешать смесь.

II этап

11. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
12. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 1500 g в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
13. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 1500 g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 45 с при 5000 g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя пункту 13.
16. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе,

ЭКСТРАКЦИЯ РНК

центрифугировать 1 мин при 6000 g на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

17. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °C на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

18. В пробирки добавить по 50 мкл РНК-буфера, используя свободный от РНКаз наконечник с фильтром.

ВНИМАНИЕ! Вскрытую пробирку с РНК-буфером хранить при температуре не выше минус 16 °C.

19. Перемешать содержимое пробирок на вортексе. Поместить в термостат при температуре 56 °C на 5 мин (встряхивая пробы на вортексе каждую мин). Центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (10 000 g) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

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