

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
«29» апреля 2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для типирования (идентификации субтипов H5, H7, H9)
вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-H5, H7, H9-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.....	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК.....	9
СОСТАВ.....	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	11
А. Подготовка пробирок для амплификации	11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	Ошибка! Закладка не определена.
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	17
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	19

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ПКО	- положительный 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
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс[®] *Influenza virus A-тип-Н5, Н7, Н9-FL*» предназначен для типирования (идентификации) субтипов Н5, Н7, Н9 вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в культурах вирусов гриппа и в биологическом материале, содержащем РНК вирусов гриппа А.

Набор реагентов «АмплиСенс[®] *Influenza virus A-тип-Н5, Н7, Н9-FL*» может быть использован при подозрении на грипп вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы кДНК, полученные из образцов следующего биологического материала от людей: мазки со слизистой носоглотки (нижний носовой ход) и ротоглотки (задняя стенка), мокрота (либо аспираты из трахеи), бронхо-альвеолярный лаваж, аутопсийный материал, в которых была обнаружена РНК *Influenza virus A*. В случае заболевания нижних дыхательных путей (бронхит, бронхиолит, пневмония) наиболее информативным материалом является мокрота (либо аспираты из трахеи) и бронхо-альвеолярный лаваж.

ПЦР-комплект следует использовать для анализа образцов кДНК, в которых была обнаружена РНК *Influenza virus A* в процессе исследования биологического материала или культур вирусов с использованием набора реагентов «АмплиСенс[®] *Influenza virus A/B-FL*» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Для экстракции РНК и получения кДНК используются наборы реагентов,

рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Типирование (идентификация) субтипов H5, H7, H9 проводится путем амплификации участков гена гемагглютинаина вируса гриппа А данных субтипов в присутствии трех флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. Считывание флуоресцентного сигнала производится по трем каналам детекции приборов непосредственно в ходе ПЦР.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²⁾
Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки, мокрота (либо аспираты из трахеи), бронхо-альвеолярный лаваж, аутопсийный материал, в которых была обнаружена РНК <i>Influenza virus A</i>	«ПЦР-комплект» вариант FRT, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты генов гемагглютинаина вирусов гриппа А заявленных субтипов (H5, H7 и H9). Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании штаммов вирусов гриппа птиц A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Гонконг/1073/99 (H9N2), A/chicken/Moscow/2/07 (H5N1), а также при исследовании экспериментальных образцов биологического материала от людей, с добавлением штаммов вирусов гриппа птиц.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении фрагментов генов гемагглютинаина вирусов гриппа А субтипов H1, H2, H3, H4, H13, H8, H6, H10, H11, H12, вирусов гриппа В, а также кДНК/ДНК штаммов и изолятов основных возбудителей ОРЗ человека, нормальной микрофлоры полости носа и ротоглотки человека и ДНК человека.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты тестирования характеристик набора реагентов:

Описание образцов	Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Influenza virus</i> А-тип-Н5, Н7, Н9-FL»
Биологический материал, содержащий ³⁾ РНК вируса гриппа А/Н5	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Положительные 100%
	Мокрота	100 шт	Положительные 100%
	Аутопсийный материал	100 шт	Положительные 100%

²⁾ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду.

³⁾ В качестве образцов, содержащих вирусы гриппа А/Н5, А/Н7 и А/Н9 использовались модельные образцы биологического материала, содержащие рекомбинантные стандартные образцы предприятия.

Описание образцов	Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Influenza virus</i> А-тип-Н5, Н7, Н9-FL»
Биологический материал, содержащий ³⁾ РНК вируса гриппа А/Н7	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Положительные 100%
	Мокрота	100 шт	Положительные 100%
	Аутопсийный материал	100 шт	Положительные 100%
Биологический материал, содержащий ³⁾ РНК вируса гриппа А/Н9	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Положительные 100%
	Мокрота	100 шт	Положительные 100%
	Аутопсийный материал	100 шт	Положительные 100%
Биологический материал, не содержащий ⁴⁾ РНК вирусов гриппа А/Н5, А/Н7, А/Н9	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Отрицательные 100%

В соответствии с представленными данными **диагностическая чувствительность** набора реагентов для всех типов биологического материала составляет 98-100 % с доверительной вероятностью 90 %.

Диагностическая специфичность набора реагентов составляет 98-100 % с доверительной вероятностью 90 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического 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

⁴⁾ В качестве образцов, не содержащих вирусы гриппа А/Н5, А/Н7 и А/Н9 использовались образцы биологического материала от больных с подозрением на грипп, содержащие вирус гриппа А/Н1N1pdm2009, вирусы парагриппа, и риновирусы, что было доказано при тестировании с наборами реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus* А/В-FL», «АмплиСенс® *Influenza virus* А/Н1-swine-FL» и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL».

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 Экстракции, 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. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар-с», «Ламинарные системы», Россия).
2. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)), планшетного типа (например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США)) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F:

- 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) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК/ДНК

При проведении всех манипуляций следует руководствоваться инструкцией по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*». Тестирование культур вирусов гриппа рекомендуется проводить после предварительного разведения до концентрации не более 10^5 ГЭ/мл (т.е. значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX, полученное при использовании набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*», должно быть не ниже значения *Ct* для K+ *Influenza virus A / Influenza virus B / ST1* по тому же каналу).

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК субтипов **H5, H7 и H9 *Influenza virus A*** с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-FL <i>Influenza virus A</i> H5, H7, H9 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	55 пробирок вместимостью 0,2 мл
ПЦР-буфер-А	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К+ <i>Influenza virus A</i> H5, H7, H9	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК субтипов **H5, H7 и H9 *Influenza virus A*** с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-FL <i>Influenza virus A</i> H5, H7, H9	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ <i>Influenza virus A</i> H5, H7, H9	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Предшествующие этапы ПЦР-исследования: экстракцию РНК из исследуемых образцов и обратную транскрипцию, следует проводить в соответствии с инструкцией и методическими рекомендациями к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*».

Детальная информация по процедуре проведения амплификации в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов для типирования (идентификации) субтипов H5, H7, H9 вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A-тип-H5, H7, H9-FL*».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 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 кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Influenza virus A H5, H7, H9*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-А**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-FL *Influenza virus A H5, H7, H9***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.

4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл К–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл К+ *Influenza virus A H5, H7, H9***.

A2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

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

1. Разморозить пробирки с **ПЦР-смесью-FL *Influenza virus A H5, H7, H9***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Influenza virus A H5, H7, H9***, **ПЦР-буфером-В** и **полимеразой (TaqF)** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-FL *Influenza virus A H5, H7, H9***, **5*(N+1) ПЦР-буфера-В** и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**. (Расчетную таблицу приготовления реакционных смесей см. в приложении 1).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК**.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл К–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл К+ *Influenza virus A H5, H7, H9***.

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

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

программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации для приборов роторного и планшетного типа

Цикл	Приборы роторного типа ⁵⁾			Приборы планшетного типа ⁶⁾		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-50 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с		54	25 с	
		детекция флуоресц. сигнала			детекция флуоресц. сигнала	
72	10 с	72	25 с			

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX⁷⁾.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! Перед установкой в амплификатор планшетного типа необходимо осадить капли со стенок пробирок кратковременным (1–3 с) центрифугированием на центрифуге/вортексе.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁵⁾ Например, Rotor-Gene 3000/Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶⁾ Например, ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁷⁾ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

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 трем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК гена гемагглютинаина вируса гриппа А субтип Н5,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК гена гемагглютинаина вируса гриппа А субтип Н7,
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК гена гемагглютинаина вируса гриппа А субтип Н9.

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.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- В исследуемом образце **идентифицирован вирус гриппа А субтип Н5**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.
- В исследуемом образце **идентифицирован вирус гриппа А субтип Н7**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.
- В исследуемом образце **идентифицирован вирус гриппа А субтип Н9**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.

- Если в исследуемом образце отсутствуют значения *Ct* по заданному каналу детекции, следует считать, что в этом образце данный субтип вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение порогового цикла *Ct* по соответствующему каналу превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца. При повторении результатов или получении значения *Ct* менее порогового цикла, образец следует считать положительным.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации) субтипов H5, H7, H9 вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A-тип-H5, H7, H9-FL*», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Результаты для контролей ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>		
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора ROX
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	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 какому-либо каналу детекции отсутствует или превышает граничное значение,

необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых получены отрицательные результаты по соответствующему каналу детекции.

2. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по какому-либо каналу детекции определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых получен положительный результат по соответствующему каналу детекции.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Для формы комплектации 1 (вариант FRT) – 9 мес. Для формы комплектации 2 (вариант FRT-50 F) – 12 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. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-буфер-В, ПЦР-смесь-FL *Influenza virus A H5, H7, H9* (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F), полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Рекламации по качеству набора реагентов «**АмплиСенс®** *Influenza virus A-тип-Н5, Н7, Н9-FL*» направлять в адрес ООО «ИнтерЛабСервис» (115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2), в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества (тел. (495) 664-28-84, (495) 925-05-54, факс (495) 664-28-89, e-mail: products@pcr.ru)⁸⁾.

...

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

И.о. генерального директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»



Е.Н. Родионова

В.Н. Михеев

⁸⁾ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru..






ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ⁹⁾	ПЦР-смесь-FL <i>Influenza virus</i> A H5, H7, H9	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
6	60	30	3,0
8	80	40	4,0
10	100	50	5,0
12	120	60	6,0
14	140	70	7,0
16	160	80	8,0
18	180	90	9,0
20	200	100	10,0
22	220	110	11,0
24	240	120	12,0
26	260	130	13,0
28	280	140	14,0
30	300	150	15,0
32	320	160	16,0

⁹⁾ Число исследуемых образцов, включая контроли этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+2+1).

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		