

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 12.10.2012 № 1896-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
«30» июня 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

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
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Influenza virus A/B-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 | 5 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 7 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 8 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ | 9 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.... | 9 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК..... | 16 |
| ФОРМАТ FEP | 18 |
| СОСТАВ | 18 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ | 20 |
| ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК..... | 20 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ | 21 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 21 |
| Б. Проведение амплификации | 22 |
| ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» | 23 |
| ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ | 23 |
| ФОРМАТ FRT | 26 |
| СОСТАВ | 26 |
| ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК..... | 29 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» | 30 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации | 30 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .. | 31 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 33 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ | 37 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция РНК из проб..... | 39 |
| А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» | 39 |
| Б. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» | 40 |
| В. При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG | 42 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Проведение реакции обратной транскрипции при использовании комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L» | 46 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F | 47 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ | 48 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|---|
| БАЛ | - Бронхоальвеолярный лаваж |
| ВКО STI-rec | - Внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией |
| В- | - Отрицательный контроль экстракции |
| В+ | - Положительный контроль экстракции |
| К+ | - Положительный контроль ПЦР |
| К- | - Отрицательный контроль ПЦР |
| кДНК | - Комплементарная ДНК получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК |
| ОКО | - Отрицательный контрольный образец |
| ОТ | - Обратная транскрипция |
| 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 |
| FEP | - Флуоресцентная детекция по «конечной точке» |
| FRT | - Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*»** предназначен для выявления РНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) в биологическом материале (мазки из носоглотки и ротоглотки, мокрота, аспираты из трахеи, БАЛ, промывные воды бронхов, секционный материал, культуры вирусов) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя четыре этапа: экстракцию РНК из образцов исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции,

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

амплификацию участка кДНК данных вирусов и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP).

Экстракция РНК из исследуемого материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-rec), что позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Реакция обратной транскрипции проводится с целью образования комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК. Затем с полученными пробами кДНК проводится реакция амплификации участков гена *M Influenza virus A* и гена *NS Influenza virus B* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Taq-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 специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В наборе реагентов применяется «горячий старт». В комплекте реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT «горячий старт» обеспечивается разделением компонентов реакции восковой перегородкой, которая плавится на этапе денатурации. В комплекте реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F «горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF). Химически модифицированная полимеразы активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

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

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 5 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 6 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации кДНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 3, 4, 5 и 6 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации кДНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

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

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 5 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «РЕВЕРТА-L» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 6 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «РЕВЕРТА-L» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации кДНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 3, 4, 5 и 6 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего, экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции и

амплификации кДНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

| Вид биологического материала | Возбудитель | Комплект для экстракции РНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствительность ² , ГЭ/мл |
|--|---|---|---|---|
| Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки | Вирус гриппа А (<i>Influenza virus A</i>) | РИБО-сорб, РИБО-преп, NucliSENS easyMAG | «ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F, FEP | 1x10 ³ |
| | Вирус гриппа В (<i>Influenza virus B</i>) | РИБО-сорб, РИБО-преп, NucliSENS easyMAG | «ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F, FEP | 1x10 ³ |

Аналитическая специфичность

Набор реагентов позволяет обнаружить фрагменты кДНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*). Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании эталонных штаммов и изолятов эпидемических вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2, выделенных с 1977 по 2011 гг. в РФ, республиках Украина и Беларусь, вирусов гриппа А, выделенных от животных (Н1N1, Н2N2, Н2N3, Н2N9, Н3N2, Н3N8, Н4N6, Н5N1, Н5N3, Н5N2, Н5N3, Н6N2, Н7N1, Н8N4, Н9N2, Н10N7, Н11N6, Н12N5, Н13N2), вирусов гриппа В линий Ямагата и Виктория, а также штамма А/California/07/2009 пандемического вируса гриппа А/Н1N1pdm2009.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении кДНК/ДНК других вирусных (респираторно-синцитиальный вирус человека штамм «Лонг», риновирусы человека (типы 13, 15, 16, 17, 21, 26 и 29), вирусы герпеса,

² Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

цитомегаловирус, энтеровирусы (типы Echo9, Echo30)) и бактериальных (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumonia*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*) возбудителей ОРЗ, нормальной микрофлоры носоглотки и ротоглотки и кДНК/ДНК человека, а также при исследовании клинического материала содержащего: респираторно-синцитиальные вирусы (типы А и В), вирусы парагриппа (типы 1-4), коронавирусы человека ОС43, E229, NL63, НКUI, аденовирусы человека групп В, С и Е, метапневмовирусы человека, бокавирус человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне

Формат FEP Форма 1: REF V36-50-Mod-R0,5-FEP, REF H-0801-2-5;

Форма 2: REF V36-50-Mod-R0,2-FEP, REF H-0802-2-2; Формат FRT Форма 1: REF R-V36-Mod,

REF H-0801-1-2, Форма 2: REF R-V36-F, REF H-0802-1 / VER 20.06.12 / стр. 8 из 48

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 (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
- 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. Реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки – «Транспортная среда для хранения и

Формат FEP Форма 1: [REF](#) V36-50-Mod-R0,5-FEP, [REF](#) H-0801-2-5;

Форма 2: [REF](#) V36-50-Mod-R0,2-FEP, [REF](#) H-0802-2-2; Формат FRT Форма 1: [REF](#) R-V36-Mod,

[REF](#) H-0801-1-2, Форма 2: [REF](#) R-V36-F, [REF](#) H-0802-1 / [VER](#) 20.06.12 / стр. 9 из 48

транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

2. Реагент для проведения предварительной подготовки мокроты и аспиратов вязкой консистенции – «МУКОЛИЗИН» (ТУ 9398-159-01897593-2011) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
3. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
4. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (503CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
5. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (300202, Deltalab, Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).
6. 0,9% раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0 – для предварительной подготовки секционного материала, а также в случае исследования культур микроорганизмов.
7. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (для форм комплектации 1 и 2).

Экстракция РНК из исследуемых образцов и проведение реакции обратной транскрипции РНК

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например,

Ахуген, США).

5. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Ахуген, США).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Ахуген, США).
7. Штативы для пробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Ахуген, США).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

При использовании комплектов реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) или «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008):

11. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
12. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс г.
13. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
14. Одноразовые наконечники до 200 мкл.
15. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

16. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
17. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнитная силика) (bioMérieux, Франция))

При использовании комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008):

18. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

19. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
20. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия).
21. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 (0,5) мл (например, Ахуген, США).
22. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Ахуген, США).
23. Штативы для наконечников (например, Ахуген, США) и пробирок объемом 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

ПЦР и гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации

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 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб кДНК.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP:

9. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).
10. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по

применению данного набора реагентов).

При работе с «ПЦР-комплектom» вариант FRT:

11. 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), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США)), SmartCycler II в комплекте со специальной центрифугой Mini-Spin (Cepheid, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектom» вариант FRT-100 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;
 - в) специальные реакционные модули для прибора SmartCycler II.

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.

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой носоглотки (нижнего носового хода) и задней стенки ротоглотки,

- мокрота (либо аспираты из трахеи),
- бронхо-альвеолярный лаваж или промывные воды бронхов,
- секционный материал (фрагменты пораженной части легких, бронхов),
- культуры вирусов.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как один образец. Для этого берут мазки разными зондами сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Взятие мазков со слизистой нижнего носового хода

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Мазки у детей и взрослых берут сухим стерильным назофарингеальным велью-тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3–4 см для детей и 5–6 см для взрослых). После забора материала конец зонда с тампоном опускают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку герметично закрывают и маркируют.

Для взятия мазков у взрослых допустимо использовать сухие стерильные зонды из полистирола с вязкими тампонами. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу,

вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5–6 см). После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Взятие мазков из ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Допускается хранение материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

Мокрота или аспират из трахеи

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой. Аспираты из трахеи получают традиционным способом и помещают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

Бронхо-альвеолярный лаваж или промывные воды бронхов собирают в одноразовые плотно закрывающиеся емкости из

полипропилена объемом не менее 5 мл. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и исследуют в течение 1 ч либо замораживают сразу после взятия. Допускается хранение до проведения исследования в течение 7 сут при температуре не выше минус 16 °С. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами и др. материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

Мокрота или аспират из трахеи. Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Бронхо-альвеолярный лаваж или промывные воды бронхов. Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл

жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

Секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

Культуры вирусов используют без предварительной подготовки, для экстракции РНК используют 10 мкл культуральной жидкости.

**ФОРМАТ FEP
СОСТАВ**

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

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|-----------------------|---|------------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 22,5 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ³ | 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 из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

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

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ³ | 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 из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав форм комплектации 5 и 6.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 – комплект

³ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

реагентов для получения кДНК на матрице РНК – включает:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| RT-G-mix-1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01 | 5 пробирок |
| RT-mix | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,125 | 5 пробирок |
| Ревертаза (MMIV) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3, 4, 5, 6.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации кДНК *Influenza virus A* и *Influenza virus B* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|---|--------------------------------|-----------|------------------------------------|
| ПЦР-смесь-1-FL <i>Influenza virus A/B</i> раскапана под воск | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПЦР-смесь-Фон | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| Минеральное масло для ПЦР ⁴ | Бесцветная вязкая жидкость | 4,0 | 1 флакон |
| ПКО кДНК <i>Influenza virus A / Influenza virus B / STI</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|-------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ВКО STI-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,12 | 5 пробирок |

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

⁴ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Обратная транскрипция.
- Амплификация.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов/автоматические станции, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-сорб**» порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК из проб», раздел А.
- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-преп**» порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК из проб», раздел Б.
- при использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот **NucliSENS easyMAG** (BioMerieux, Франция) порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК из проб», раздел В.

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится

в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-rec**).

Для проведения реакции обратной транскрипции используется комплект реагентов **«РЕВЕРТА-L»**, рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с данным комплектом реагентов см. в приложении 2.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесь-1-FL *Influenza virus A/B*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B***.
3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить 2 образца **«Фон»**. Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B*** на поверхность застывшего воска внести по **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесь-1-FL *Influenza virus A/B***. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР**.
5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК**.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл** ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI*.

в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из образца **В–**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования/ амплификации (см. табл. 1).

2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/B*

| Амплификатор с активным регулированием (по раствору в пробирке): | | | | | | | | | |
|---|----------------------|----------|------------------|--|----------|------------------|----------------------|----------|------------------|
| «Терцик» | | | | GeneAmp PCR System 2700, Gradient Palm Cycler, MyCycler, MaxyGene | | | Uno-2, Biometra | | |
| Цикл | Темпе- ратура, °С | Время | Кол-во циклов | Темпе- ратура, °С | Время | Кол-во циклов | Темпе- ратура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 0 | 95 °С | пауза | | 95 °С | пауза | | 95 °С | пауза | |
| 1 | 95 °С | 5 мин | 1 | 95 °С | 5 мин | 1 | 95 °С | 5 мин | 1 |
| 2 | 95 °С | 10 с | 42 | 95 °С | 10 с | 42 | 95 °С | 25 с | 42 |
| | 54 °С | 20 с | | 54 °С | 25 с | | 54 °С | 40 с | |
| | 72 °С | 10 с | | 72 °С | 25 с | | 72 °С | 25 с | |
| 3 | 72 °С | 1 мин | 1 | 72 °С | 1 мин | 1 | 72 °С | 1 мин | 1 |
| 4 | 10 °С | хранение | | 10 °С | хранение | | 10 °С | хранение | |

Примечание – Программы амплификации для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях 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*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

3. По окончании выполнения программы приступить к

флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса гриппа В (*Influenza virus B*).
- по каналу ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*).

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] *Influenza virus A/B-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб кДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов следующий:

- РНК *Influenza virus A* **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу ROX выше установленного порогового значения положительного результата.
- РНК *Influenza virus B* **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения положительного результата.
- РНК *Influenza virus A* **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу ROX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.
- РНК *Influenza virus B* **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX и ROX ниже установленного порогового значения отрицательного результата и сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца с этапа экстракции РНК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа. Для образца «К–» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX или ROX выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями). В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов считать образец положительным.

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

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Конт-роль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Сигнал по каналу | | | Обозначение результата в программах некоторых детекторов |
|-----------|--------------------------------------|---|---|---|--|
| | | FAM | HEX | ROX | |
| V- | Экстракция РНК | <u>Выше</u> порогового значения | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | «-» или «ОК» |
| K- | ПЦР | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | «нд» или «ОК» |
| K+ | ПЦР | <u>Выше</u> порогового значения | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | «+» или «ОК» |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу **HEX** и **ROX** ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК вируса гриппа, соответствующего данному флуорофору.
2. Если для отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу **HEX** и **ROX** выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК вируса гриппа, соответствующего данному флуорофору, начиная с этапа экстракции РНК.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Вариант 50</i> | | <i>Вариант 100</i> | |
|------------------------------|---|-------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость ⁵ | 22,5 | 1 флакон | 45 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость ⁵ | 20 | 1 флакон | 40 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон | 100 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон | 40 | 1 флакон |
| Сорбент | Суспензия белого цвета | 1,25 | 1 пробирка | 1,25 | 2 пробирки |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 5 пробирок | 0,5 | 10 пробирок |

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

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 5.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Вариант 50</i> | | <i>Вариант 100</i> | |
|---------------------------------|---|-------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
| Раствор для лизиса | Прозрачная жидкость голубого цвета ⁵ | 15 | 1 флакон | 30 | 1 флакон |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 20 | 1 флакон | 40 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 3 | Прозрачная бесцветная жидкость | 25 | 1 флакон | 50 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 4 | Прозрачная бесцветная жидкость | 10 | 1 флакон | 20 | 1 флакон |
| РНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки | 1,2 | 8 пробирок |

⁵ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 6.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

| Реактив | Описание | Вариант 50 | | Вариант 100 | |
|------------------|--------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | Объем, мл | Кол-во | Объем, мл | Кол-во |
| RT-G-mix-1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01 | 5 пробирок | 0,01 | 10 пробирок |
| RT-mix | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,125 | 5 пробирок | 0,125 | 10 пробирок |
| Ревертаза (MMiv) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03 | 1 пробирка | 0,06 | 1 пробирка |
| ДНК-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка | 1,2 | 2 пробирки |

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на проведение 120 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 5 и 6.

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

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|---|--------------------------------|-----------|----------------------------------|
| ПЦР-смесь-1-FL <i>Influenza virus A/B</i> раскапана под воск | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,008 | 55 пробирок объемом 0,2 мл |
| ПЦР-смесь-2-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,77 | 1 пробирка |
| ПКО кДНК <i>Influenza virus A / Influenza virus B / STI</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

ФОРМАТ FRT

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|-------------|--------------------------------|-----------|------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| ВКО STI-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,12 | 5 пробирок |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 3, 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации кДНК *Influenza virus A* и *Influenza virus B* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|---|--------------------------------|-----------|------------|
| ПЦР-смесь-1-FL-F <i>Influenza virus A/B</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 5 пробирок |
| ПЦР-смесь-2-FRT | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,06 | 1 пробирка |
| ПКО кДНК <i>Influenza virus A / Influenza virus B / STI</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ТЕ-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

| Реактив | Описание | Объем, мл | Кол-во |
|-------------|--------------------------------|-----------|-------------|
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 2 пробирки |
| ВКО STI-rec | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,12 | 10 пробирок |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 2, 5, 6.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Обратная транскрипция.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-

исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК

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

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов/автоматические станции, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-сорб**» порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК из проб», раздел А.
- при использовании комплекта реагентов «**РИБО-преп**» порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК из проб», раздел Б.
- при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот **NucliSENS easyMAG** (BioMerieux, Франция) порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция РНК из проб», раздел В.

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-rec**).

Для проведения реакции обратной транскрипции используется комплект реагентов «**РЕВЕРТА-L**», рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с данным комплектом реагентов см. в приложении 2.

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 – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B* для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B*.
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 ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI*.
 - в) отрицательный контроль экстракции (В-) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца В-.

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

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

1. Разморозить необходимое количество пробирок с ПЦР-

смесью-1-FL-F *Influenza virus A/B*. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL-F *Influenza virus A/B***, **ПЦР-смесью-2-FRT** 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-1-FL-F *Influenza virus A/B***, **5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT**, и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**. (Расчетную таблицу приготовления реакционных смесей см. в приложении 3).
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 ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI***.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из образца **В–**.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 3а и 3б).

Таблица 3а

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/B* для приборов роторного и планшетного типа

| Цикл | Приборы роторного типа ⁶ | | | Приборы планшетного типа ⁷ | | |
|------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------------------------|--|---------------|
| | Температура, °С | Время | Кол-во циклов | Температура, °С | Время | Кол-во циклов |
| 1 | 95 | 5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F) | 1 | 95 | 5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 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 ROX.

Таблица 3б

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/B* для прибора SmartCycler (Cepheid, США)

| Цикл | Температура, °С | Время | Измерение флуоресценции | Кол-во циклов |
|---------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|---------------|
| Hold/Удерж. темп-ры | 95 | 900с (вариант FRT-100 F) | – | 1 |
| Stage1/ Циклирование 1 | 95 | 15 с | – | 42 |
| | 54 | 25 с | детекция флуоресц. сигнала | |
| | 72 | 25 с | – | |

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE (Cy3) и ROX (Texas Red).

Примечание – Программы амплификации для других моделей амплификаторов описаны в методических

⁶ 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.

⁷ 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.

рекомендациях 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! Перед установкой в амплификатор 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.

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 ВКО.
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса гриппа В (*Influenza virus B*).
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*).

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

- РНК вируса гриппа А **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- РНК вируса гриппа В **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- РНК вирусов гриппа А и В **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофора ROX и JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t , а значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора FAM не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора HEX или ROX, и по каналу для флуорофора FAM значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора ROX или JOE превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение, а значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора FAM не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование

соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов считать образец положительным.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации 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*», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов 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 |
| В- | Экстракция РНК | Определено значение меньше граничного | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К- | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного | Определено значение меньше граничного |

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **ROX** или **JOE** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в

которых не обнаружена РНК вируса гриппа, соответствующего данному флуорофору.

2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналу для флуорофора **ROX** или **JOE** определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК вируса гриппа, соответствующего данному флуорофору, начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Для всех форм комплектации варианта FEP – 9 мес. Для форм комплектации 1, 3, 4 (вариант FRT), 5, 6 (вариант FRT-100 F) – 9 мес. Для формы комплектации 2 (вариант FRT-100 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. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект», хранить при температуре от 2 до 8 °С.

ПЦР-смесь-1-FL-F *Influenza virus A/B*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

ПЦР-смесь-1-FL *Influenza virus A/B* и ПЦР-смесь-1-FL-F *Influenza virus A/B* хранить в защищенном от света месте.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-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)⁸.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента Российской Федерации

Е.Л. Никонов



ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ПРОБ

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая В–). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО STI-rec**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО STI-rec** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с фильтром. Перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре от 3 до 5 мин.
4. В пробирку В– внести **100 мкл ОКО**.
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 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. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 8.
11. 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.
12. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
13. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтром, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 2-3 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 и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции. Отбирать раствор для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная РНК может храниться до 4 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 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

Формат FEP Форма 1: [REF](#) V36-50-Mod-R0,5-FEP, [REF](#) H-0801-2-5;

Формат 2: [REF](#) V36-50-Mod-R0,2-FEP, [REF](#) H-0802-2-2; Формат FRT Форма 1: [REF](#) R-V36-Mod, [REF](#) H-0801-1-2, Форма 2: [REF](#) R-V36-F, [REF](#) H-0802-1 / [VER](#) 20.06.12 / стр. 40 из 48

- на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-гес** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-гес** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В-) внести **100 мкл ОКО**.
 4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
 5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
 6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
 7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
 8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки и 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.
 9. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
 10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
 11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
 12. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
 13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

14. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге.
17. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.

Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °C, более длительно – при температуре не выше минус 68 °C.

В. При использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG

Вариант 1. Экстракция РНК с лизисом образца вне прибора

Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК – установить **Other**, объем образца (**Volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **25 mkl**, тип образца (**Type**) – **Lysed**, очередность экстракции РНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: **On-board Lysis Buffer Dispensing – No, On-board Lysis Incubation – No**.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции

РНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-rec**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объемом 1,5 мл. После окончания инкубации (**см. п. 8**) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с **буфером для лизиса** и **ВКО STI-rec** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром, и тщательно перемешать пипетированием. Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.
7. В пробирку, предназначенную для отрицательного контроля экстракции (**B-**) внести **100 мкл ОКО**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов вне прибора (**Off board**).
11. После окончания экстракции РНК извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.

При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после экстракции. Очищенные РНК можно хранить до 4 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.

Вариант 2. Экстракция РНК с лизисом образца в приборе

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (**Matrix**) для экстракции РНК – установить **Other**, объем образца (**Volume**) – **0,1 ml**, объем элюции (**Eluate**) – **25 mkl**, тип образца (**Type**) – **Primary**, очередность экстракции РНК в образцах (**Priority**) – **Normal**.
3. Создать новый протокол экстракции РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: **On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes**.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции РНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая **B–**). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-rec**.
6. В пробирки с **ВКО** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку, предназначенную для отрицательного контроля экстракции (**B–**) внести **100 мкл ОКО**.
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (**On board**).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении **Instrument State – Idle**.
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора, в каждую пробирку внести отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика

должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.

11. Закрывать крышку прибора и продолжить программу экстракции РНК.

12. После окончания экстракции РНК извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.

При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после экстракции. Очищенные РНК можно хранить до 4 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Проведение реакции обратной транскрипции при использовании комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L»
Общий объем реакции – 20 мкл, объем пробы РНК – 10 мкл.

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

Порядок работы

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix внести **5 мкл RT-G-mix-1** и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMIV)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. Внести в пробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечник с барьером, добавить **10 мкл пробы РНК** в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) при температуре 37 °С на 30 мин.
7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к **20 мкл кДНК** отдельным наконечником с фильтром добавить **20 мкл ДНК-буфера**, перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с на вортексе для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

| Объем реагента на одну реакцию, мкл | Объем реактивов на указанное количество реакций | | |
|-------------------------------------|---|-----------------|-------------------|
| | 10,0 | 5,0 | 0,5 |
| Число реакций ⁹ | ПЦР-смесь-1-FL-F <i>Influenza virus A/B</i> | ПЦР-смесь-2-FRT | 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 контроль этапа экстракции РНК (N), контроли этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+3+1).

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 | | |