

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
набора реагентов
АмплиСенс® *Influenza virus B-тип-FL*

Только для исследовательских и иных немедицинских целей

АмплиСенс®



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

RUO

Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100)	11
СОСТАВ	11
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	11
А. Подготовка проб для амплификации	11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	12
В. Анализ и интерпретация результатов	13
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F)	16
СОСТАВ	16
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка проб для амплификации	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	17
В. Анализ и интерпретация результатов	18
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхоальвеолярный лаваж
ВКО STI-rec	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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* В-тип-FL не является медицинским изделием. Набор реагентов предназначен для типирования (дифференциации линий Виктория и Ямагата) вирусов гриппа В в образцах кДНК, полученных из биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспираты из трахеи, БАЛ, секционный (аутопсийный) материал, культуры вирусов гриппа В), содержащего РНК вирусов гриппа В, методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения кДНК *Influenza virus* В в исследуемых образцах с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus* А/В-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на одновременной амплификации участков кДНК *Influenza virus* В линий Виктория и Ямагата и кДНК экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО STI-rec¹) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в

¹ ВКО STI-rec добавляется на этапе экстракции РНК *Influenza virus* В при исследовании образцов с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus* А/В-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

режиме «реального времени». ВКО STI-rec позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Аmplification участка кДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых кДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов (форма 2) содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО STI-rec	кДНК <i>Influenza virus B</i> (линия Виктория)	кДНК <i>Influenza virus B</i> (линия Ямагата)
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	HA (hemagglutinin)	HA (hemagglutinin)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Формы 1, 2 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять кДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции и обратной транскрипции РНК.

Формы 1, 2 рассчитаны на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Проба кДНК, полученная в результате экстракции и обратной транскрипции РНК, экстрагированной из биологического материала	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, вариант FRT-100 F	1x10 ³

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» инструкции к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки кДНК заявленных микроорганизмов в концентрации от 1x10³ до 1x10⁵ ГЭ/мл:

- вирусов гриппа В линии Ямагата – B/Florida/04/2006, B/Bangladesh/3333/2007, B/Wisconsin/01/2010, B/Massachussetts/02/2012 Egg, B/Massachussetts/02/2012 MDCK, B/Phuket/3073/2013 Egg, B/Phuket/3073/2013 MDCK, B/Hong Kong/3417/2014, B/Saint-Petersburg/118/2017, B/Saint-Petersburg/160/2015, B/Yakutsk/R1106/2019, B/Krasnodar/1/2019;
- вирусов гриппа В линии Виктория – B/Maryland/15/2016 MDCK, B/Maryland/15/2016 Egg, B/Colorado/6/2017 MDCK, B/Colorado/6/2017 Egg, B/Ireland/3154/2016, B/Hong Kong/514/2009, B/Hong Kong/269/2017 MDCK, B/Hong Kong/269/2017 Egg, B/Norway/2409/2017, B/South Australia/81/2012, B/Astrakhan/2/2017, B/Arkhangelsk/R1101/2018, B/Irkutsk/5/2018, B/Irkutsk/20/2014, B/Brisbane/60/2008, B/Brisbane/46/2015, B/Saint-Petersburg/40/2009, B/Saint-Petersburg/144/2013, B/Saint-Petersburg/163/2016, B/Saint-Petersburg/148/2017, B/Ekaterinburg/02/2010.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании кДНК/ДНК следующих микроорганизмов/штаммов в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл:

- вирусов гриппа А субтипов H1N1, H1N1(sw2009) (штаммы - A/California/07/2009, A/Michigan/45/2015), H3N2 (штаммы - A/Kansas/14/2017, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016, A/Switzerland/8060/2017), H13, H9, H8N4, H2N3, H2N9, N8, H4N6, H11N6, H12N5, H6, H10N7, H5N3, H7, H5, H5N3;
- респираторно-синцитиального вируса (*hRSV* 9320), вируса парагриппа 1 типа (*hPIV1* C35), риновируса (*hRV17* 33342), аденовируса 1 типа (*Adenoid* 71) и 6 типа (*Tonsil* 99), коронавируса (*hCoV* NL63), вируса Коксаки (*hCoxsackiev* B1 Conn-5), эховируса 4 типа (*hEchoV4* Pesascek), парэховируса 1 типа (*hParechoV1* Harris), вируса герпеса 5 типа (*hHerpesV5* AD-169), вируса кори (*Measles virus* Edmonston), вируса паротита (*Mumps virus* Enders), вируса краснухи (*Rubella virus* M-33);
- штаммов *Bordetella pertussis* Tohama I и 10-536, *Streptococcus pyogenes* MGAS 8232, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Seattle 1945, *Legionella pneumophilla* subsp. *pneumophila* Philadelphia 1, *Mycoplasma pneumoniae* PI 1428, *Chlamydophila pneumoniae* strain CM-1, *Haemophilus influenzae* L-378, *Pseudomonas aeruginosa* RH 815, *Staphylococcus epidermidis* FDA PCI 1200, *Lactobacillus plantarum* Lp 39, *Bacillus cereus* FDA 5, *Neisseria meningitidis* M2091, *Moraxella catarrhalis* strain 59632, а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов кДНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между линиями вирусов гриппа В (Ямагата и Виктория).

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в

- перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
 8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат пробы кДНК, полученные ранее на этапе экстракции и обратной

транскрипции из исследуемого материала, в которых была обнаружена кДНК *Influenza virus B* с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*».

Допускается хранение образцов кДНК *Influenza virus B* до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава набора реагентов и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на метод полимеразной цепной реакции:

- использование в качестве исследуемых образцов проб кДНК, полученных ранее на этапе экстракции и обратной транскрипции из исследуемого материала, в которых уже была обнаружена кДНК *Influenza virus B*;
- использование специфичных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, комплементарных участкам выявляемых кДНК-мишеней;
- детекция искусственной нуклеотидной последовательности кДНК ВКО в качестве экзогенного внутреннего контроля.

В случае отсутствия сигнала кДНК ВКО и кДНК *Influenza virus B*, результат анализа считается невалидным.

В виду указанных особенностей состава набора реагентов и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100)**СОСТАВ**

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Influenza virus B</i>-тип раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,008	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
К+ <i>Influenza virus B</i>-тип	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Отбор проб кДНК, пригодных для анализа в соответствии с требованиями раздела «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Influenza virus B*-тип** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
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-FL *Influenza virus B*-тип**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**,

полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.

4. Поставить контрольные реакции:

а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *Influenza virus B*-тип**.

б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

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

Таблица 3

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ³			Приборы планшетного типа ⁴		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	10 с	5	95	10 с	5
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	40	95	10 с	40
	54	20 с		54	25 с	
		детекция флуоресц. сигнала			детекция флуоресц. сигнала	
72	10 с	72	25 с			

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX**.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить

³ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁴ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	кДНК ВКО STI-rec	кДНК <i>Influenza virus B</i> (линия Виктория)	кДНК <i>Influenza virus B</i> (линия Ямагата)

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 5

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	Линии вируса гриппа В не определены*
определено или отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	Определена линия Виктория вируса гриппа В
определено или отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	Определена линия Ямагата вируса гриппа В
отсутствует или больше граничного	отсутствует	отсутствует	Невалидный**

* Линии вируса гриппа В могут **не определяться** в случае низкого содержания РНК вируса гриппа В в образце, то есть при исследовании образца с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*» (формат FRT) значение *Ct* образца по каналу для флуорофора JOE превышало значение *Ct* для К+ (ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI*) более чем на 6 циклов.

** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа амплификации кДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей амплификации кДНК в соответствии с табл. 6 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)		
		FAM	JOE	ROX
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 6) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по

выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая кДНК.

3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F)**СОСТАВ**

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Influenza virus B</i> -тип	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
K+ <i>Influenza virus B</i> -тип	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

АМПЛИФИКАЦИЯ 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.

Отбор проб кДНК, пригодных для анализа в соответствии с требованиями раздела «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию

требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Influenza virus* В-тип, 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *Influenza virus* В-тип**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *Influenza virus* В-тип, ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *Influenza virus* В-тип**.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	5	95	10 с	5
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	40	95	10 с	40
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	25 с детекция флуоресц. сигнала	
		72			10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX**.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	кДНК ВКО STI-rec	кДНК <i>Influenza virus B</i> (линия Виктория)	кДНК <i>Influenza virus B</i> (линия Ямагата)

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	Линии вируса гриппа В не определены*
определено или отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	Определена линия Виктория вируса гриппа В
определено или отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	Определена линия Ямагата вируса гриппа В
отсутствует или больше граничного	отсутствует	отсутствует	Невалидный**

* Линии вируса гриппа В могут **не определяться** в случае низкого содержания РНК вируса гриппа В в образце, то есть при исследовании образца с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*» (формат FRT) значение C_t образца по каналу для флуорофора JOE превышало значение C_t для К+ (ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI*) более чем на 6 циклов.

** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа амплификации кДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей амплификации кДНК в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		
		FAM	JOE	ROX
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая кДНК.
3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой

линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *Influenza virus* В-тип хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL *Influenza virus* В-тип, ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL *Influenza virus* В-тип, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Influenza virus* В-тип хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁷.

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Только для исследовательских и иных немедицинских целей
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Дата изменения		Использовать до
	Температурный диапазон		Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель		Не допускать воздействия солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		Дата изготовления