

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

«20» ноября 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® *Yellow fever virus-FL*

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК	19
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	22
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F).....	24
СОСТАВ	24
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	24
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР	25
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».....	26
В. Анализ и интерпретация результатов	27
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L).....	31
СОСТАВ	31
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	31
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР	31
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».....	32
В. Анализ и интерпретация результатов	33
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	37
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	37
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
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
YFV	- <i>Yellow fever virus</i> , вирус жёлтой лихорадки
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Yellow fever virus-FL*, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения РНК вируса жёлтой лихорадки (*Yellow fever virus*, YFV) в биологическом материале (плазма крови, слюна, моча, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, комары) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированной из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на жёлтую лихорадку. Согласно рекомендациям центра по

контролю за заболеваниями США (CDC)¹ определение РНК вируса желтой лихорадки методом ПЦР обладает наибольшей диагностической чувствительностью в первые 3-4 дня заболевания. При летальном исходе, согласно данным CDC, РНК вируса желтой лихорадки обнаруживается методом ПЦР в аутопсийном материале, в основном в тканях печени.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-Ревертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности

¹ Center for Disease Control and Prevention. Yellow fever vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on immunization Practices (ACIP)/ MMWR 2010; 59:1-27

флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация кДНК *Yellow fever virus*, а также амплификация последовательности кДНК ВКО-FL. Результаты амплификации кДНК *Yellow fever virus* и кДНК ВКО-FL регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Yellow fever virus</i>
Область амплификации	Искусственная нуклеотидная последовательность	5'-некодирующая область и часть генома, кодирующая нуклеопротеин (5'-UTR-С-белок)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

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

Форма комплектации 1 рассчитана на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Форма комплектации 2 рассчитана на проведение 48 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Плазма крови	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Комары (гомогенат)	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Моча	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Слюна	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	5000
Плазма крови	200	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
	1000		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	100
Моча	1000		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	500

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты РНК вируса желтой лихорадки: вакцинный штамм вируса желтой лихорадки 17-D, штамм Bwamba 1441 Nyamande 207, штамм Кинтампо.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании штаммов гетерологичных флавивирусов, которые могут присутствовать в исследуемых образцах и давать ложноположительные результаты на вирус желтой лихорадки: *DENV* (*Dengue virus*, вирус денге, штамм вируса денге 1 типа DENV-1/8/Tailand/01/2013), штамм вируса денге 2 типа DENV-2/131/Philippines/12/2013), штамм вируса денге 3 типа DENV-3/25/Thailand/01/2013); штамм вируса денге 4 типа

DENV-4/122/Vietnam/11/2013), *WNV* (*West Nile virus*, вирус Западного Нила, ВЗН; штаммы Eg-101 и LEIV-Vlg99-27889-human), *JEV* (*Japanese encephalitis virus*, вирус японского энцефалита, ВЯЭ, штамм Накаяма), *TBEV* (*Tick-borne encephalitis virus*, вирус клещевого энцефалита, ВКЭ; штаммы Абсеттаров, Обор-4, Айна), *LGT* (*Langat virus*, вирус Лангат; штамм TP-21), *POWV* (*Powassan virus*, вирус Повассан; штамм Баерс), *OHFV* (*Omsk hemorrhagic fever virus*, вирус Омской геморрагической лихорадки, ОГЛ; штаммы Голошубин, Веселовка-752, Крутинка-73/640).

А также был использован штамм вируса Чикунгунья (*CHIKV*), который при инфицировании человека дает сходную клиническую картину заболевания (штамм *Ross late*).

Геномная ДНК человека, выделенная из плаценты, образцов плазмы крови, слюны и мочи, и образцы ДНК комаров *Aedes albopictus* были использованы для доказательства отсутствия перекрёстных реакций с ДНК-материалом пациента и комаров.

При тестировании образцов РНК штаммов вируса желтой лихорадки во всех случаях был получен положительный результат.

При тестировании кДНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека и комаров неспецифических реакций выявлено не было.

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Yellow fever virus-FL* в сравнении с референтным набором реагентов методом ПЦР

Тип образцов	Результаты исследования набора реагентов для диагностики <i>in vitro</i> АмплиСенс® <i>Yellow fever virus-FL</i>		Результаты сравнения с референтным набором реагентов ²	
			положительны х	отрицательны х
Плазма крови	Всего исследовано 150 образцов	положительны х	100	0
		отрицательны х	0	50
Моча	Всего исследовано 130 образцов	положительны х	80	0
		отрицательны х	0	50
Слюна	Всего исследовано 110 образцов	положительны х	60	0
		отрицательны х	0	50
Тканевой (аутопсийной, биопсийный) материал	Всего исследовано 80 образцов	положительны х	30	0
		отрицательны х	0	50
Комары	Всего исследовано 80 образцов	положительны х	30	0
		отрицательны х	0	50

Были использованы: 50 образцов плазмы крови, 50 образцов мочи, 50 образцов слюны, а также 50 образцов тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала и 50 образцов суспензий пулов комаров *Aedes albopictus*, для которых получены отрицательные результаты с использованием наборов реагентов АмплиСенс® *Yellow fever virus-FL* и ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ (ЗАО «Синтол», Россия). Из вышеуказанных образцов биологического материала были приготовлены модельные пробы, контаминированные штаммами вируса желтой лихорадки: 17D, Wamba 1441

² В качестве референтного набора использовался набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ (ЗАО «Синтол», Россия), РУ № РЗН 2016/4879 от 07.10.2016 г.

Нуаманде 207, Кинтампо в концентрациях, соответствующих аналитической чувствительности набора реагентов АмплиСенс® *Yellow fever virus-FL* и ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ (ЗАО «Синтол», Россия) согласно Таблице 4.

Таблица 4

Вид исследуемого материала	Штаммы вируса желтой лихорадки	Концентрация модельной пробы, копий/мл	Количество проб	Общее количество контаминированных (модельных) проб
Плазма крови	17-D	10^3	20	100
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	10^3	40	
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	10^2	20	
	Кинтампо	10^3	20	
Моча	17-D	10^3	20	80
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	10^3	20	
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	$5 \cdot 10^2$	20	
	Кинтампо	10^3	20	
Слюна	17-D	10^3	20	60
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	10^3	20	
	Кинтампо	10^3	20	
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал	17-D	$5 \cdot 10^3$	10	30
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	$5 \cdot 10^3$	10	
	Кинтампо	$5 \cdot 10^3$	10	
Комары (суспензии комаров <i>Aedes albopictus</i>)	17-D	10^3	10	30
	Bwamba 1441 Нуаманде 207	10^3	10	
	Кинтампо	10^3	10	

Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® Yellow fever virus-FL

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность ⁴ , (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %
Плазма крови	97,5 – 100	95 – 100
Моча	96,5 – 100	95 – 100
Слюна	96 – 100	95 – 100
Комары	91 – 100	95 – 100
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал	91 – 100	95 – 100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»⁵, 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

³ Относительно использованного референтного набора реагентов для искусственно контаминированных образцов.

⁴ Относительно использованного референтного набора.

⁵ В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные.
- Инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁶, биологический материал, включая материалы, 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁷. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁷ Для удаления надсадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- 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 строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- 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.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

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

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
2. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
4. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша или аналогичная).

Предварительная подготовка исследуемого материала

5. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ПУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки слюны.
6. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буфер (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
7. Глицерин для проведения пробоподготовки мочи.
8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и комаров (например, Tissue Lyser LT (QIAGEN

GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), или аналогичный).

13. Микрочентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
14. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
15. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
16. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
17. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
18. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

19. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп» (РУ ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ ФСР 2010/07265) или другие комплекты, рекомендованные Производителем.
20. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

21. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и другие рекомендованные Производителем).
22. Набор реагентов (например, «МАГНО-сорб» (РУ ФСР 2010/07265)) и набор расходных материалов к автоматической станции.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

23. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-50 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 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.
24. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
26. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
27. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
28. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
29. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Производителем).
30. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
31. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
32. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма крови,
- тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал,
- слюна,
- моча,
- комары.

Плазма крови

Для получения образцов плазмы крови забор крови проводят утром натощак в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого центрифугируют пробирки с цельной кровью при 800-1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. Полученную плазму отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал

Материал отбирают чистым стерильным инструментом (например, пинцет) в стерильные пластиковые контейнеры объемом 50 мл с плотно закрывающимися крышками или пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание

материала.

Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный контейнер объемом 50-60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов. Если нет возможности исследовать материал в течение 1 суток после забора, то необходимо провести предобработку материала.

Допускается хранение образцов материала:

- при от 2 до 8 °С температуре – в течение 24 часов.

Не допускается замораживание материала!

Слюна

Перед получением слюны проводят трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Комары

Собраный материал разбирают в лаборатории по видам, полу, местам и датам сбора и помещают в сухие чистые пробирки объемом 2,0 мл. При объединении комаров в пулы число особей в одном пуле не должно превышать 50.

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С или в сосуде Дюара с жидким азотом – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК

Образцы плазмы крови не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки, если на исследование предоставлены образцы мутной мочи. В этом случае в пробирки объемом 1,5 мл отобрать по 1200 мкл мочи. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. 100 мкл полученной осветленной мочи используют для экстракции РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» или 1000 мкл осветленной мочи используют для экстракции РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб». Если материал будет исследован позже, чем через 1 сутки после забора, необходимо перенести по 1100 мкл мочи в несколько пробирок объемом 1,5 мл. Если предполагается экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп», в пробирки с 1100 мкл мочи внести глицерин в объеме 10 % от объема пробы (120 мкл), перемешать на вортексе для равномерного распределения глицерина. Если предполагается экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб», глицерин в мочу не вносить, моча замораживается без глицерина.

Допускается хранение образцов материала с глицерином и без глицерина:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы (аутопсийного, биопсийного) материала требуют предварительной подготовки.

Для экстракции РНК берут 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани готовят 10% суспензию на охлаждённом стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для этого на 1 объём растёртой ткани добавляют 9 объёмов физиологического раствора или фосфатного буфера.

Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. 100 мкл полученной осветленной суспензии используют для экстракции РНК.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов биопсийного материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Комары требуют предварительной подготовки.

Предварительно формируют пулы комаров (не более 50 особей). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 30 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Для приготовления суспензий комаров используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора (например, Tissue Lyser LT) применяют следующие параметры для гомогенизации комаров (диаметр шариков – 5 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 5 мин; объем буфера – 700 мкл (пул из 25 комаров), 1500 мкл (пул из 50 комаров).

Допускается хранение предварительно обработанных комаров до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Слюна требует предварительной подготовки.

Перед экстракцией нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение слюны, используя реагент «МУКОЛИЗИН». В емкость со слюной добавляют «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:3 (1 часть слюны к 3 частям «МУКОЛИЗИНА»), ориентируясь по градуировке емкости. В

процессе разжижения слюны (10 минут) емкость периодически встряхивают на вортексе. Для экстракции РНК используют 100 мкл разжиженной слюны.

Допускается хранение предварительно разжиженной слюны до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования не пригодны образцы плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта. Гепарин является ингибитором ПЦР («МУ 1.2.2741-10. 1.2. Гигиена, токсикология, санитария. Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных. Методические указания»).

Сведения о других интерферирующих веществах при условии соблюдения правил взятия и предварительной подготовки исследуемого материалах, указанных в инструкции, отсутствуют.

Для снижения риска получения ложноотрицательного результата из-за наличия в пробе интерферирующих веществ в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции РНК из плазмы крови, слюны, мочи, тканевого (аутопсийный, биопсийный) материала, комаров в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК из мочи и плазмы крови в соответствии с инструкцией и методическими рекомендациями к используемому комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем **ВКО-FL** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО YFV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию РНК в **100 мкл** буфера для элюции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» для 200 мкл образца:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем **ВКО-FL** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **190 мкл ОКО и 10 мкл ПКО YFV**.

Объем элюции – **50 мкл**; при использовании автоматических станций для экстракции РНК – **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию РНК в **100 мкл** буфера для элюции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» для 1000 мкл образца:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем **ВКО-FL** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **1000 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **1000 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **990 мкл ОКО** и **10 мкл ПК ОУФV**.

Объем элюции – **50 мкл**; при использовании автоматических станций для экстракции РНК – **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию РНК в **100 мкл** буфера для элюции.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ-ПЦР рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели и при температуре не выше минус 68 °С до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента гДНК *Yellow fever virus* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL YFV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
K+ YFV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО YFV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	7 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и 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.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от

используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL YFV, 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,5 мкл полимеразы (TaqF), 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv), 0,25 мкл RT-G-mix-2**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL YFV**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL YFV, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMIv), RT-G-mix-2**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК 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 РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

7. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ YFV**.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО YFV**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей.

Б. Проведение ОТ-ПЦР 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. 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁸ и планшетного⁹ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Производителем.

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Производителем.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

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 необходимо 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 ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

Таблица 7

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Yellow fever virus</i>

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 РНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 8

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
Определено меньше граничного	Отсутствует	РНК <i>Yellow fever virus</i> НЕ обнаружена
Определено или отсутствует*	<u>Определено</u> меньше граничного	РНК <i>Yellow fever virus</i> обнаружена
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**
Определено меньше граничного	Определено больше граничного	Сомнительный***

* Отсутствие сигнала по каналу для флуорофора FAM несущественно, если РНК *Yellow fever virus* обнаружена.

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

*** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	Отсутствует	Отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE 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 ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE 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 РНК.

5. 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 КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента гДНК *Yellow fever virus* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь YFV-Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
К+ YFV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО YFV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	7 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесь YFV-Lyo для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов (количество

контрольных образцов см. в пункте 3.

2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ YFV**.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К-**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО YFV**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ОТ-ПЦР 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.10).

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного¹⁰ и планшетного¹¹ типа**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10с	–	45
	60	20с	FAM, JOE	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

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 необходимо 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 ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

¹⁰ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Производителем.

¹¹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Производителем.

Таблица 11

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Yellow fever virus</i>

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 РНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)		Результат
FAM	JOE	
Определено меньше граничного	Отсутствует	РНК <i>Yellow fever virus</i> НЕ обнаружена
Определено или отсутствует*	<u>Определено</u> меньше граничного	РНК <i>Yellow fever virus</i> обнаружена
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**
Определено меньше граничного	Определено больше граничного	Сомнительный***

* Отсутствие сигнала по каналу для флуорофора FAM несущественно, если РНК *Yellow fever virus* обнаружена.

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

*** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 13 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 13

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	<u>Определено</u> меньше граничного	Отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	Отсутствует	Отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>Определено</u> меньше граничного	<u>Определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE 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 ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE 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 РНК.

4. 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.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F и вариант FRT-L при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL YFV, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv), RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL YFV хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты ПЦР-смесь YFV-Луо хранить в пакетах с влагопоглотителем, в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель 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:

cs@pcr.ru)¹².

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Генеральный директор

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Р.А. Максютлов

¹² 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		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	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
	Дата изготовления		Беречь от влаги