

«УТВЕРЖДАЮ»

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



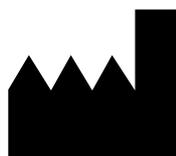
А.В. Горелов

«10» Зулема 2024г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А
(*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	20
СОСТАВ.....	22
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	24
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ	25
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	25
А. Подготовка проб для амплификации	25
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	27
В. Анализ и интерпретация результатов	28
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	32
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- нуклеиновая кислота
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
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
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FEF	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*»** предназначен для качественного определения и дифференциации РНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева или трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал) и в культурах вирусов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала и прошедшие этап обратной транскрипции.

Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах

отсутствуют.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на грипп вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для посмертной идентификации РНК *Influenza virus A* и РНК *Influenza virus B* в аутопсийном материале.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL), проведении реакций обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых микроорганизмов 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.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента ревертазы (ММIV). Затем проводится амплификация участка кДНК 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 в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата – при работе с формой 2.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Influenza virus B</i>	кДНК <i>Influenza virus A</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	NS gene of <i>Influenza virus B</i>	M1 gene of <i>Influenza virus A</i>

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT

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

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

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Характеристики были определены при использовании комплектов для экстракции РНК/ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) и «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265).

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева или	<i>Influenza virus A</i>	1x10 ³

Вид исследуемого материала	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал, культуры вирусов	<i>Influenza virus B</i>	

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 участки кДНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) при исследовании штаммов из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева»: А/Санкт-Петербург/НИИГ-252/19 (*Influenza virus A* (H3N2)), А/Калининград/75/19 (*Influenza virus A* (H1N1) pdm09), В/Washington/02/19 (*Influenza virus B* линия Виктория), В/Якутск/НИИГ-06/2019 (*Influenza virus B* линия Ямагата) в концентрации не менее 1×10^3 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов, а также геномной ДНК человека:

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США): *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 49619™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Strain Seattle 1945 (ATCC® 25923™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™), *Moraxella catarrhalis* (ATCC® 8193™), *Neisseria mucosa* (ATCC® 19693™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™), *Mycoplasma pneumoniae*, Strain PI 1428 (ATCC® 29085™), *Chlamydophila pneumoniae*, Strain CM-1 (ATCC® VR-1360™), *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*, Strain Philadelphia 1 (ATCC® 33152™), *Staphylococcus epidermidis*, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™), *Bacillus cereus*, Strain FDA 5 (ATCC® 10702™), *Human Respiratory Syncytial Virus*, Strain 9320 (ATCC® VR-955™), *Human Respiratory Syncytial Virus*, Strain A-2 (ATCC® VR-1540™), *Human Parainfluenza Virus 1*, Strain C35 (ATCC® VR-94™), *Human Parainfluenza Virus 2*, Strain Greer (ATCC® VR-92™), *Human Parainfluenza Virus 3*, Strain C243 (ATCC® VR-93™), *Human Rhinovirus 17*, Strain

- 33342 (ATCC® VR-1663™), *Human Adenovirus 1*, Strain Adenoid 71 (ATCC® VR-1™), *Human Coronavirus*, Strain OC43 (ATCC® VR-1558™), *Human Coronavirus*, Strain 229E (ATCC® VR-740™), *Human Coxsackievirus B1*, Strain Conn-5 (ATCC® VR-28™), *Human Echovirus 4*, Strain Pesascek (ATCC® VR-1734™), *Human Herpesvirus 1*, Strain HF (ATCC® VR-260™), в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;
- штаммы из коллекции ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов) *Haemophilus influenzae* 423, *Streptococcus pyogenes* Dick – I, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* №25, *Proteus mirabilis* 3177, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Escherichia coli* M 17, *Salmonella typhimurium* 79, *Yersinia enterocolitica* 134, *Bordetella pertussis* 703 L 6, *Mycobacterium Bovis Ravenel* №700204 в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;
 - образцы панели «CORONAVIRUS RNA SPECIFICITY PANEL» (Erasmus Medical Center – EMC, Роттердам, Нидерланды): Severe acute respiratory syndrome *coronavirus* Strain HKU39849, Middle East respiratory syndrome *coronavirus*, *Human coronavirus*, Strain NL63 в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^7 ГЭ/мл;
 - ДНК человека в концентрации 0,2 мг/мл.

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

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие РНК вируса гриппа А и РНК вируса гриппа В, с концентрацией 5×10^3 копий/мл каждого, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах

короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
<i>Influenza virus A</i>	10	100	30	100
<i>Influenza virus B</i>	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы образцы, полученные из Референс-центра по мониторингу за возбудителями инфекций верхних и нижних дыхательных путей и Лаборатории молекулярных методов ОМДиЭ от пациентов с подтвержденным диагнозом гриппа, а также от пациентов с иной этиологией заболевания. В испытания было взято 1030 проб биологического материала:

- 510 образцов биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева или трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал) от пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом гриппа;
- 100 модельных образцов бронхоальвеолярного лаважа / промывных вод бронхов, аутопсийного материала, содержащих рекомбинантный стандартный образец предприятия;
- 150 образцов мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки от пациентов с иной этиологией заболевания (COVID-19, парагрипп, аденовирусная инфекция, респираторно-синцитиальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека, вызванная CoV NL63, CoV OC43, CoV 229E, CoV HKU1);
- 100 образцов мокроты/аспираты из зева или трахеи от пациентов с иной этиологией заболевания (COVID-19,

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*);

- 70 образцов бронхоальвеолярного лаважа / промывных вод бронхов от пациентов с иной этиологией заболевания (COVID-19, легионеллезная инфекция);
- 100 образцов аутопсийного материала от пациентов с иной этиологией заболевания (COVID-19).

Этиология заболевания для каждого пациента была установлена при тестировании с наборами реагентов «АмплиСенс® COVID-19-FL» (ПУ № РЗН 2021/14026), «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ПУ № ФСР 2011/11258), АмплиСенс® Пневмо-квант-FL (ПУ № РЗН 2022/16467), «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» (ПУ № ФСР 2010/07097), АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL (ПУ № РЗН 2019/8445), «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (ПУ № ФСР 2012/13998).

Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

**Результаты тестирования набора реагентов
«АмплиСенс® *Influenza virus A/B*-FL» в сравнении с
референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® <i>Influenza virus A/B</i> -FL»		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Всего исследовано 350 образцов	<i>Influenza virus A</i> положительных	100	0
		<i>Influenza virus B</i> положительных	100	
		отрицательных	0	150
Мокрота / аспират из зева или трахеи	Всего исследовано 250 образцов	<i>Influenza virus A</i> положительных	100	0
		<i>Influenza virus B</i> положительных	50	
		отрицательных	0	100
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	Всего исследовано 175 образцов	<i>Influenza virus A</i> положительных	50	0
		<i>Influenza virus B</i> положительных	55	
		отрицательных	0	70
Аутопсийный материал	Всего исследовано 255 образцов	<i>Influenza virus A</i> положительных	100	0
		<i>Influenza virus B</i> положительных	55	
		отрицательных	0	100

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*»**

Вид исследуемого материала	Микроорганизм	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	<i>Influenza virus A</i>	100 (96-100) %	100 (98-100) %
	<i>Influenza virus B</i>	100 (96-100) %	100 (98-100) %
Мокрота / аспират из зева или трахеи	<i>Influenza virus A</i>	100 (96-100) %	100 (96-100) %
	<i>Influenza virus B</i>	100 (93-100) %	100 (96-100) %
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	<i>Influenza virus A</i>	100 (93-100) %	100 (95-100) %
	<i>Influenza virus B</i>	100 (94-100) %	100 (95-100) %
Аутопсийный материал	<i>Influenza virus A</i>	100 (96-100) %	100 (96-100) %
	<i>Influenza virus B</i>	100 (94-100) %	100 (96-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и 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 «Формы комплектации»).

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

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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 клинично-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, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы,

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011).
2. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).
3. Зонд медицинский одноразовый стерильный (например, ООО «ФармМедПолис РТ», Россия (РУ № РЗН 2021/13989)).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
6. Пастеровская пипетка объемом не менее 3,0 мл (например, Sarstedt, Германия).

Предварительная подготовка исследуемого материала

7. Реагент «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки образцов, содержащих слизь.
8. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид,

- 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
 10. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
 11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
 12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
 13. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
 14. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
 15. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
 16. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
 17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», АО «Ульяновское конструкторское бюро приборостроения», Россия).
 18. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
 19. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 20. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 21. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

22. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
23. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

24. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)).
25. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК «открытого типа» (например, KingFisher Flex (Termo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (РУ № ФСЗ 2009/05562)), Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. («Ханчжоу Аошенг Инструментс Ко., Лтд.»), Китай (РУ № РЗН 2022/16430))).
26. Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции.

Обратная транскрипция

27. Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – «РЕВЕРТА-L» (РУ № ФСР 2008/03994).
28. Дополнительные материалы и оборудование для проведения реакции обратной транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для получения кДНК на матрице РНК.

Аmplификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

29. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
30. Штативы для пробирок объемом 0,1, 0,2 или 0,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
31. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.»», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
32. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит

- Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
34. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
35. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
36. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
37. 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) – для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) – при использовании прибора роторного типа.
38. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399))).
39. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше, которое располагается на сайте www.amplisens.ru.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки,
- мокрота / аспират из зева или трахеи,
- бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов,
- аутопсийный материал,
- культуры вирусов.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки берут двумя сухими стерильными зондами в одну пробирку с транспортной средой последовательно: сначала со слизистой оболочки нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, и исследуются как один образец. Не рекомендуется использовать зонды, изготовленные из природных материалов (дерево, вата).

Мазки со слизистой оболочки носоглотки

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется освободить носовые ходы (высморгаться). Сухой стерильный зонд вводят по боковой стенке носа горизонтально в нижний носовой ход и удаляют вдоль боковой стенки носа. Глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3–4 см для детей и 5–6 см для взрослых). После взятия материала часть зонда с мазком помещают в пробирку с 0,5–1,0 мл транспортной среды и, придерживая крышкой пробирки, отламывают рукоятку зонда с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Мазок берут сухим стерильным зондом вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала часть зонда с мазком помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку герметично закрывают, встряхивают, чтобы увлажнить оба зонда, маркируют.

Допускается хранение мазков со слизистой оболочки носо- и

ротоглотки до проведения предобработки:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мокрота / аспират из зева или трахеи

Образцы собирают согласно МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» и помещают в одноразовые герметичные емкости из полипропилена. Если нет возможности получить мокроту или аспират из зева, собирают слюну, образующуюся утром после глубокого откашливания сразу после пробуждения.

Допускается хранение мокроты / аспирата из зева или трахеи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов

Образцы объемом не менее 5 мл собирают согласно МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» и помещают в одноразовый плотно завинчивающийся пластиковый контейнер.

Допускается хранение бронхоальвеолярного лаважа / промывных вод бронхов до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Аутопсийный материал

Образцы помещают в стерильные одноразовые контейнеры и исследуют в течение 1 ч либо замораживают сразу после взятия.

Допускается хранение аутопсийного материала до проведения предобработки при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Культуры вирусов

Согласно МР «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики» из оригинального флакона отобрать 1,0 мл материала и перенести в пробирку, используя пастеровскую пипетку.

Допускается хранение культур вирусов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 24 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 7 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева или трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал требуют предварительной подготовки.

Культуры вирусов не требуют предварительной подготовки.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе в течение 5 с для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Если уровень жидкости в пробирке ниже отметки 0,5 мл, следует увеличить объем, добавив физиологический раствор до 0,5 мл, перемешать и осадить на вортексе в течение 5 с для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. При наличии в образце слизи в пробу добавляют реагент «МУКОЛИЗИН» до отметки 1 мл, инкубируют при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически помешивая на вортексе, в течение 5 мин (до снижения вязкости). Далее образцы центрифугируют в течение 5 мин при 0,6 тыс. g (например, 3 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Для экстракции РНК отбирают 100 мкл

образца. При необходимости повторного проведения анализа остаток образца замораживают.

Мокрота / аспират из зева или трахеи

Вязкая по консистенции мокрота / аспират зева или трахеи подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с образцом добавляется пятикратное количество реагента «МУКОЛИЗИН» относительно количества образца и инкубируется при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) при периодическом помешивании в течение 10-20 мин (до визуального просветления). Далее образец переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 0,6 тыс. g (например, 3 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf), 100 мкл супернатанта используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток образца замораживают.

Бронхо-альвеолярный лаваж / промывные воды бронхов

Содержимое емкости перемешивают пипетированием наконечником с фильтром и отбирают 100 мкл для экстракции РНК.

Аутопсийный материал

Образец гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков (или гомогенизаторов), готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 6,7 тыс. g (например, 10 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток образца замораживают.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 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

Для контроля эффективности экстракции РНК, обратной транскрипции и реакции амплификации 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.

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 6).

Были протестированы модельные образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокроты / аспирата из зева или трахеи, бронхоальвеолярного лаважа / промывных вод бронхов, аутопсийного материала без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. В модельные образцы добавляли также стандартные образцы предприятия, содержащие РНК вируса гриппа А и РНК вируса гриппа В, с концентрацией каждой мишени равной 5×10^3 ГЭ/мл.

Результаты, полученные с помощью комплектов для экстракции «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб», представлены в табл. 6.

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции	
				«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Эндогенные вещества	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	н/т
		Гемоглобин	0,21 г/мл	Обнаружено	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено	Не обнаружено
Мокрота /	Эндогенные	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	н/т

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции	
				«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»
аспират из зева или трахеи	вещества		9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	Не обнаружено
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	Эндогенные вещества	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	нт
			9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	Не обнаружено
	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено	
Аутопсийный материал	Эндогенные вещества	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено

Примечание – «нт» означает, что данную концентрацию не тестировали, так как не было установлено интерференции более высокой концентрации данного вещества при экстракции комплектом реагентов «МАГНО-сорб».

СОСТАВ

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Influenza virus A/B</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета, раскапана под воск	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A / Influenza virus B / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Входит в состав формы комплектации 1.

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Influenza virus A/B</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A / Influenza virus B / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Входит в состав формы комплектации 2.

Реагенты комплекта «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения

(см. раздел «Хранение»). Данный 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.

Программное обеспечение AmpliSens® *Influenza virus A/B* Soft версии 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используют комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» (в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции);
- «МАГНО-сорб» применяется совместно с автоматическими станциями «открытого типа»⁴ (в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции и с использованием соответствующего протокола экстракции).

Экстракцию РНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL. В каждую группу экстрагируемых образцов необходимо включать по одному повтору отрицательного (ОК) контроля. ОК проходит все этапы ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. ОК позволяет контролировать возможную контаминацию исследуемых образцов.

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

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

Объем исследуемого образца (кроме культур вирусов) – **100 мкл**.

Объем исследуемого образца культур вирусов – **10 мкл культур вирусов и 90 мкл ОКО**.

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

Объем элюции – **90 мкл**.

⁴ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Объем ВКО-FL – **10 мкл** на один образец.

Объем исследуемого образца (кроме культур вирусов) – **100 мкл**.

Объем исследуемого образца культур вирусов – **10 мкл культур вирусов и 90 мкл ОКО**.

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используется **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! ОТ 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 однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

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

Для получения кДНК на матрице РНК используется комплект реагентов «РЕВЕРТА-L». Порядок работы с комплектом реагентов «РЕВЕРТА-L» смотрите в инструкции к комплекту реагентов для получения кДНК на матрице РНК.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

А1. Подготовка проб при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL Influenza virus A/B** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных 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-1-FL *Influenza virus A/B***.
 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 ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI***.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы**, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При получении новой серии набора реагентов необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

A2. Подготовка проб при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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-1-FL *Influenza virus A/B***, **5 мкл ПЦР-буфера-В** 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 несколько реакций (см. Приложение 1).

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL *Influenza***

- virus A/B***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B*, ПЦР-буфером-В и полимеразой (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL *Influenza virus A/B*, ПЦР-буфера-В 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 ПКО кДНК *Influenza virus A / Influenza virus B / STI***.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При получении новой серии набора реагентов необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Influenza virus A/B* Soft, согласно руководству оператора;
- Примечание – Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.
- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения

программы, указанной в табл. 7, согласно инструкции по его применению.

Таблица 7

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/B* и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶				
	Температура, °С	Время		Кол-во циклов	Температура, °С	Время		Кол-во циклов
1	95	вариант FRT	5 мин	1	95	вариант FRT	5 мин	1
		вариант FRT-100 F	15 мин			вариант FRT-100 F	15 мин	
2	95	10 с		10	95	10 с		10
	54	20 с			54	25 с		
	72	10 с			72	25 с		
3	95	10 с		35	95	10 с		35
	54	20 с			54	25 с		
		детекция флуоресц. сигнала				детекция флуоресц. сигнала		
	72	10 с		72	25 с			

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

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

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

⁵ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFХ96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»)) и другие, рекомендованные Изготовителем.

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

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Influenza virus B</i>	кДНК <i>Influenza virus A</i>

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят вручную с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Influenza virus A/B* Soft версия 1. Порядок работы с ПО AmpliSens® *Influenza virus A/B* Soft версия 1 описан в руководстве оператора.

Для анализа и интерпретации результатов используют значения *Ct*, полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Influenza virus A/B* Soft значения *Ct* определяются автоматически.

Принцип интерпретации результатов указан в табл. 9:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	РНК <i>Influenza virus A</i> и В НЕ обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	РНК <i>Influenza virus B</i> обнаружена
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Influenza virus A</i> обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует	отсутствует	Невалидный*
определено или отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	Сомнительный**

* 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 РНК. В случае повторения аналогичного результата образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 10 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция РНК	определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+):
 - а) значение *Ct* по каналам для флуорофоров ROX и/или JOE отсутствует или превышает граничное. Невозможна интерпретация результатов исследуемых образцов по соответствующему каналу. Для получения результатов по данному каналу необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 - б) значение *Ct* по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное. Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 9.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK):
 - а) по каналам для флуорофоров ROX и/или JOE определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-

- контаминация от пробы к пробе 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 обнаружен аналит, определяемый по данному каналу, начиная с этапа экстракции РНК.
- б) значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное. Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 9.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–):
- а) по каналам для флуорофоров ROX и/или JOE определено значение 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 обнаружен аналит, определяемый по данному каналу.
- б) по каналу для флуорофора FAM определено значение Ct . Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружены определяемые аналиты. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию таких образцов.
4. Для исследуемого образца определено значение Ct , при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии, или при анализе результатов в автоматическом режиме, 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.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Influenza virus A/B* 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-1-FL *Influenza virus A/B*, ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-1-FL *Influenza virus A/B*, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Influenza virus A/B* 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.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции AmpliSens® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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 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.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Схема приготовления реакционных смесей при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F для проведения амплификации

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реагентов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ⁷	ПЦР-смесь-1-FL <i>Influenza virus A/B</i>	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
6	60	30	3,0
8	80	40	4,0
10	100	50	5,0
12	120	60	6,0
14	140	70	7,0
16	160	80	8,0
18	180	90	9,0
20	200	100	10,0
22	220	110	11,0
24	240	120	12,0
26	260	130	13,0
28	280	140	14,0
30	300	150	15,0
32	320	160	16,0

⁷ Число исследуемых образцов, включая контроль этапа экстракции РНК (N), контроли этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+3+1).

