

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор центра постгеномных технологий
Федерального государственного бюджет-
ного учреждения «Центр стратегического
планирования и управления медико-биоло-
гическими рисками здоровью» Федераль-
ного медико-биологического агентства
(ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

Г.А. Шипулин

«12»

05

2026 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК вирусов

Западного Нила и Усуту

методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест® ЛЗН / Усуту»



ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
119121, Российская Федерация,
г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ, КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ И СОСТАВ НАБОРА	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	13
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	18
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	23
ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	23
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	23
Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп Экстра» вариант 50	23
Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра» вариант 50 вручную с использованием магнитного штатива	25
Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра» вариант 50 и автоматической станции	29
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	32
А. Подготовка проб для амплификации	32
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	33
В. Анализ и интерпретация результатов.....	34
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	37
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	40

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ЛЗН	- Лихорадка Западного Нила
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГА	- гемагглютинирующая активность
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК-мишени (1 копия), содержащейся в 1 геноме вируса
ГКВ	- государственная коллекция вирусов
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
НК	- нуклеиновые кислоты
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
КОЕ	- колониеобразующая единица, показывающая количество микробных клеток
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИБ	- потенциально интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
СанПиН	- санитарно-эпидемиологические правила и нормы
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
БОЕ/мл	- бляшкообразующие единицы на миллилитр
ТСID ₅₀ /мл, ТЦД ₅₀ /мл	- тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50 % клеток монослоя
LD ₅₀ /мл, ЛД ₅₀ /мл	- средняя летальная доза, вызывающая гибель 50 % животных
ИД ₅₀ /мл	- инфицирующая доза, вызывающая инфицирование лабораторной тест-системы (животные, культура клеток) в 50 % случаев
WNV	- вирус Западного Нила
USUV	- вирус Усуту

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК вирусов Западного Нила и Усуту методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® ЛЗН / Усуту», (далее – набор реагентов «АмплиТест® ЛЗН / Усуту», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для качественного определения РНК вируса Западного Нила и вируса Усуту в биологическом материале человека (цельная венозная кровь с К2ЭДТА или К3ЭДТА в качестве антикоагулянта, сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – для диагностики *in vitro*, а именно для выявления лихорадок Западного Нила и Усуту.

Популяционные, демографические аспекты применения

Выявление РНК вируса Западного Нила и вируса Усуту методом ПЦР проводится пациентам с клинической симптоматикой Лихорадки Западного Нила, Лихорадки Усуту, при лихорадках, головной и мышечной боли, сыпях, неврологических симптомах разной степени тяжести с подозрением на инфекции, вызванные укусами кровососущих членистоногих, сразу после первичного осмотра, вне зависимости от их половой и возрастной категории, расовой принадлежности.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекции, вызванные укусами кровососущих членистоногих, вне

зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в том числе для ранней диагностики.

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

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.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип исследования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), с проведением на следующем этапе реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых вирусов и кДНК ВКО IC-R1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

ВКО IC-R1 позволяет контролировать все этапы ОТ-ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования, служит для исключения ложноотрицательных результатов.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью ревертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-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 флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

При исследовании одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции ОТ-ПЦР – реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК вируса Западного Нила, реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК вируса Усуту, реакция обратной транскрипции РНК и амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации регистрируются по 3 различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM	JOE (HEX)	ROX
кДНК-мишень	ВКО IC-R1	кДНК вируса Западного Нила (WNV)	кДНК вируса Усуту (USUV)
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	5`UTR – С ген	3`UTR

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ, КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ И СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов выпускается в двух формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «**РИБО-преп Экстра**» вариант 50 и «**ПЦР-комплект**» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «**Магно-Сорб Экстра**» вариант 50 и «**ПЦР-комплект**» вариант FRT-50 F.

Все формы комплектации набора реагентов предназначены для выполнения полного ОТ-ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», что позволяет определять и дифференцировать РНК вируса Западного Нила и РНК вируса Усуту в качественном формате.

Форма 1 предназначена для полного исследования биологического материала человека (цельной венозной крови, сыворотки крови, спинномозговой жидкости и мочи) ручным способом экстракции.

Форма 2 предназначена для полного исследования биологического материала человека (цельной венозной крови, сыворотки крови, спинномозговой жидкости и мочи) как ручным, так и автоматическим способом экстракции.

Набор реагентов рассчитан на проведение 50 определений, включая контроли.

Комплект поставки:

- Набор реагентов «АмплиТест® ЛЗН / Усуту»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

Состав набора

«РИБО-преп Экстра» вариант 50 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	23	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,25	4 пробирки

К комплекту реагентов «РИБО-преп Экстра» вариант 50 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПКО РНК WNV/USUV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

¹ При хранении при температуре от 2 до 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

«РИБО-преп Экстра» вариант 50 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 1.

«Магно-Сорб Экстра» вариант 50 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
Раствор для лизиса Плюс	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ²	70	2 флакона
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	1,0	2 пробирки
Раствор для отмывки Плюс	Прозрачная бесцветная жидкость	85	1 флакон
Часть 2			
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 флакон

К комплекту реагентов «Магно-Сорб Экстра» вариант 50 часть 2 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	10 пробирок
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПКО РНК WNV/USUV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

² При хранении при температуре от плюс 2 до плюс 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

«Магно-Сорб Экстра» вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 2.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК вирусов Западного Нила и Усуту с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL WNV/USUV	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Taq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведения 50 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 50 тестов), включая контроли. Входит в состав форм 1 и 2.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® ЛЗН / Усуту»

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча	«РИБО-преп Экстра»	5×10^2
Цельная венозная кровь		5×10^3

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча	«Магно-Сорб Экстра»	2×10^2
Цельная венозная кровь		1×10^3

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 РНК вируса Западного Нила:

- чувствительность к линии 1 и линии 2 подтверждена *in vitro* на штамме «R-Ср-2024» 30-26 (линия 1) ($1,7 \times 10^7$ ГЭ/мл) из коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, и на штаммах «3266» ГKB 725/2 (линия 2) ($8,7 \times 10^6$ ГЭ/мл) и «48-3Н» ГKB 932/2 (линия 2) ($1 \times 10^{6,8}$ LD₅₀/мл) из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского;

- чувствительность к линиям 3, 4(4a), 5(1c), 7, 8, 9(4b) подтверждена *in silico*.

Набор реагентов обнаруживает РНК вируса Усуту:

- чувствительность к линии AF2 подтверждена *in vitro* на штамме «SA AR-1776» 260-1 (1×10^6 TCID₅₀/мл, $1,6 \times 10^6$ ГЭ/мл) из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского;

- чувствительность к линиям AF3, EU1, EU2, EU3, EU4, EU5 подтверждена *in silico*.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании штаммов вируса японского энцефалита «K40 Пекин-1» ГKB 679/2 криптограмма R/1:4/8:S/SV ($1 \times 10^{6,8}$ LD₅₀/мл), вируса клещевого энцефалита штамм «Вологда-2» ГKB1153/2 Урало-Сибирский подвид, вируса ECHO типа 1 «Faroun T10» ГKB 171 (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки А7 «МКВ-4» ГKB 2298 (1×10^6 TCID₅₀/мл), вируса кори «Mvi/Moscow.Rus/05.99» ГKB 2360 (1×10^5 TCID₅₀/мл), вируса гриппа А (субтип H2N3) «А/Утка/Германия/1215/73» ГKB 1565 ($1 \times 10^{5,5}$ ЛД₅₀/мл), вируса Хантаан «Уссури-4590» ГKB 710/2 I

серотип (1×10^5 ИД₅₀/мл), вируса Пуумала «K27/Уфа-85» ГKB 986/2 из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского; вируса Денге серотип 2 (1×10^5 БОЕ/мл) из ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова; полиовируса тип 1 Sabin вакцинный 622 ($1 \times 10^{8,6}$ ТЦД₅₀/мл) из коллекции ФГБНУ «ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН; вируса простого герпеса I типа «248/Ленинград/88» (1×10^6 ТЦД₅₀/мл) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.С.Смородинцева; штаммов *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538 ($1,3 \times 10^7$ копий/мл), *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 не менее 1×10^8 КОЕ/мл, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 700603 не менее 1×10^8 КОЕ/мл из коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России; препарата геномной ДНК человека № D7011 («Sigma-Aldrich», США) (0,2 мг/мл).

Отсутствие перекрестных реакций доказано на клиническом материале, содержащем ДНК/РНК других возбудителей инфекций: образцах сыворотки крови, содержащих РНК гепатита А, ДНК гепатита В, образцах цельной венозной крови, содержащих РНК/ДНК вируса иммунодефицита человека, ДНК цитомегаловируса человека, клинических и модельных образцах спинномозговой жидкости, содержащих РНК энтеровируса человека, ДНК *Staphylococcus aureus*, образцах мочи, содержащих ДНК *Staphylococcus aureus*, модельных образцах мочи, содержащих РНК вируса денге; для каждого возбудителя инфекции по 25 образцов клинического материала. Наличие РНК/ДНК возбудителей инфекций подтверждено с помощью ПЦР наборов реагентов «Ампли-Сенс® MRSA скрин титр-FL» по ТУ 9398-190-01897593-2012 (ПУ № ФСР 2012/13998); «АмплиСенс® HBV-FL» (ПУ № ФСР 2007/00585); «АмплиСенс® HAV-FL» по ТУ 9398-105-01897593-2012 (ПУ № ФСР 2010/07304); АмплиСенс® Dengue virus-FL по ТУ 9398-239-01897593-2016 (ПУ № РЗН 2017/6465); АмплиСенс® РНК/ДНК-ВИЧ-FL (ПУ № РЗН 2022/17316); «АмплиСенс® CMV-FL» по ТУ 9398-192-01897593-2011 (ФСР 2012/13532).

При тестировании вышеперечисленных образцов неспецифических (ложноположительных или

ложноотрицательных) реакций (результатов) выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК вирусов Западного Нила, Усуту и внутреннего контрольного образца (ВКО IC-R1).

ВКО IC-R1 добавляется в каждый образец биологического материала на этапе экстракции РНК. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы, объем, условия/срок хранения и транспортировки которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции выбрали эндогенные (гемоглобин, билирубин, триглицериды, альбумин, глюкоза, мочевины) и экзогенные (новокаин, гепарин, динатриевая соль ЭДТА, йод раствор спиртовой 5 %, тобрамицин) вещества, которые могут присутствовать в исследуемом образце биологического материала (сыворотке крови, цельной венозной крови, спинномозговой жидкости, моче).

Результаты оценки представлены в табл. 3*.

Таблица 3 — Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ*

Биологический материал	Вид ПИВ	Потенциальный интерферент	Концентрация в образце	Наличие интерференции
Сыворотка крови	Эндогенные вещества	Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
		Билирубин	20 мг/дл	Не обнаружено
		Триглицериды	33 мг/мл	Не обнаружено
		Альбумин	50 мг/мл	Не обнаружено

Биологический материал	Вид ПИВ	Потенциальный интерферент	Концентрация в образце	Наличие интерференции
	Экзогенные вещества	Новокаин	0,05 мг/мл	Не обнаружено
Цельная венозная кровь	Эндогенные вещества	Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
		Билирубин	20 мг/дл	Не обнаружено
		Триглицериды	33 мг/мл	Не обнаружено
		Альбумин	50 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гепарин	12 МЕ/мл	Обнаружено
		Na ₂ ЭДТА	2,0 мг/мл	Не обнаружено
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Йод	0,0015 %	Не обнаружено
Моча	Эндогенные вещества	Мочевина	90 мг/дл	Не обнаружено
		Альбумин	5 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Тобрамицин	51,4 ммоль/л	Не обнаружено

* Допускается использование смесей интерферентов при исследовании их влияния на результаты анализа

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования (с учетом повторяемости) определена для набора реагентов в двух лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах.

Испытания показали 100 % воспроизводимость и повторяемость результатов исследования.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) набора реагентов представлены в табл. 4.

Таблица 4 — Диагностические характеристики испытуемого набора реагентов «АмплиТест® ЛЗН/Усуту»

Показатель	Вид используемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Форма 1			
РНК вируса Западного Нила	Цельная венозная кровь	90,0-100 %	92,9-100 %
	Сыворотка крови	90,0-100 %	92,9-100 %

Показатель	Вид используемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	90,0-100 %	92,9-100 %
	Моча	90,0--100 %	92,9-100 %
РНК вируса Усуту	Цельная венозная кровь	86,3-100 %	92,9-100 %
	Сыворотка крови	86,3-100 %	92,9-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	86,3-100 %	92,9-100 %
	Моча	86,3-100 %	92,9-100 %
Форма 2			
РНК вируса Западного Нила	Цельная венозная кровь	90,0-100 %	92,9-100 %
	Сыворотка крови	90,0-100 %	92,9-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	90,0-100 %	92,9-100 %
	Моча	90,0-100 %	92,9-100 %
РНК вируса Усуту	Цельная венозная кровь	86,3-100 %	92,9-100 %
	Сыворотка крови	86,3-100 %	92,9-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	86,3-100 %	92,9-100 %
	Моча	86,3-100 %	92,9-100 %

Клинические испытания были проведены с использованием следующих приборов: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (РУ № ФСР 2011/10229).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, должны проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и 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».

В соответствии с требованиями санитарных правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» лабораторные исследования клинического материала, подозрительного на заражение вирусом Западного Нила, без накопления возбудителя с использованием метода амплификации нуклеиновых кислот, проводят в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с материалом, зараженным или подозрительным на заражение ПБА III-IV групп патогенности.

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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах 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, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, 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.

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

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения

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

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 набора»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов 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 (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных 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 и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

- 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 реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови Vacuette. Для получения цельной крови проводится забор венозной крови в пробирку с К2ЭДТА или с К3ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для получения сыворотки крови забор венозной крови проводится в пробирку без антикоагулянта.
2. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный.
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся или завинчивающиеся пробирки с крышками объемом 1,5 - 2,0 мл, стерильные.
4. Иглы пункционные.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
2. Автоматическая станция для экстракции НК, зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям (при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра»):
 - возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с данной Инструкцией;
 - наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнитного сорбента;
 - наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;
 - наличие системы перемешивания жидкостей

шейкированием или пипетированием.

3. Магнитный штатив для пробирок объемом 5 мл, диаметр 12 мм, или магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2,0 мл (при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра»).
4. Микроцентрифуга-вортекс (не менее 12 тыс g).
5. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью нагрева от 25 до 100 °С.
6. Термостат для пробирок объемом 5 мл с возможностью нагрева от 25 до 100 °С.
7. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл, от 1000 до 5000 мкл.
8. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
9. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
10. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 5 мл, диаметром 12 мм, круглодонные (при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра»).
11. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 2 мл круглодонные (при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра»).
12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, до 200 и до 1000 мкл.
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 5000 мкл (при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра»).
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл.
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 1000 мкл (при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра»).

16. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников.
17. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
19. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл для приготовления реакционной смеси.
 - 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 – при использовании прибора планшетного типа;
 - тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, 20, 200 и 1000 мкл.
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
5. Микроцентрифуга-вортекс.
6. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 0,5 до 10 мкл, от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл.
7. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий не менее 3 независимых каналов флуоресцентной детекции (FAM, HEX, ROX), зарегистрированный в РФ и удовлетворяющий следующим требованиям:
 - точность поддержания температуры не более $\pm 0,4$ °С;

- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
 - скорость охлаждения не менее 1 °С/сек;
 - для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С.
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная венозная кровь;
- сыворотка крови;
- спинномозговая жидкость (СМЖ);
- моча.

Цельная венозная кровь

Взятие венозной крови проводится утром натощак в пробирку с раствором К2ЭДТА или К3ЭДТА.

ВНИМАНИЕ! Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия.

Допускается хранение образцов крови до проведения ОТ-ПЦР-исследования при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 3 суток.

Не допускается замораживание материала!

Сыворотка крови

Взятие венозной крови проводится утром натощак в пробирку (специальную вакуумную систему) без антикоагулянта.

Пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение **30 мин** до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при **800-1600 g** в течение **10 мин** при комнатной температуре, после чего отбирают

сыворотку в объеме не менее **1,0 мл** и переносят в отдельную одноразовую пробирку объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов сыворотки крови до проведения ОТ-ПЦР-исследования:

- при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – в течение 3 суток,
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Спинномозговая жидкость (СМЖ)

Спинномозговую жидкость отбирают в асептических условиях методом аспирации в объёме не менее **1,0 мл** в пробирку или контейнер с использованием одноразовых пункционных игл. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение материала до проведения исследования ОТ-ПЦР-исследования:

- при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – в течение 24 ч,
- 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 флакон или контейнер на 50-60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов.

Допускается хранение материала до проведения ОТ-ПЦР-исследования:

- при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С – в течение 24 ч,
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели,
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы сыворотки крови, цельной венозной крови, спинномозговой жидкости, мочи не требуют предварительной подготовки.

ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ОТ-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».

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп Экстра» вариант 50

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку **10 мкл ВКО IC-R1**. Добавить в пробирки по **450 мкл Раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО** внести, используя наконечники с аэрозольным барьером, подготовленных проб:
 - по **200 мкл** сыворотки крови, мочи, спинномозговой жидкости.

- по **100 мкл** цельной венозной крови.
4. В пробирку отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **100 мкл ОКО**.
В пробирку положительного контроля экстракции и ОТ-ПЦР (**ПК**) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О РНК WNV/USUV**.
 5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин** при температуре **65 °С** в термостате.
 6. Снова центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
 7. Добавить в пробирки по **600 мкл Раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
 8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **11500 g**.
 9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** без фильтра для каждой пробы.
 10. Добавить в пробирки по **500 мкл Раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
 11. Центрифугировать при **11500 g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
 12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на **200 мкл** для каждой пробы.
 13. Добавить в пробирки по **200 мкл Раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

14. Центрифугировать при **11500 g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
15. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник без фильтра на **200 мкл**.
16. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
17. В каждую пробирку добавить по **100 мкл РНК-буфера**.
18. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
19. Центрифугировать пробирки при **11500 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК/ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °C – длительно. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °C.

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра» вариант 50 вручную с использованием магнитного штатива

1. **Раствор для лизиса Плюс** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 60 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Промаркировать пробирки.
3. Смешать в отдельной пробирке на 5 мл **ВКО IC-R1**, **Буфер GT** и **Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО IC-R1**, **30 мкл Буфера GT** и **30 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.

4. Внести в пробирки по **70 мкл подготовленной смеси ВКО**, буфера GT и магнитного сорбента.
5. Добавить в пробирки по **2,6 мл Раствора для лизиса Плюс**.
6. Добавить в каждую пробирку с раствором для лизиса Плюс по **1 мл** исследуемых образцов сыворотки крови, спинномозговой жидкости, мочи или по **0,5 мл** исследуемых образцов цельной венозной крови, и тщательно перемешать на вортексе.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **1 мл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции и ОТ-ПЦР (**ПК**) внести по **990 мкл ОКО** и по **10 мкл ПКО РНК WNV/USUV**. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.
8. Прогреть пробирки **10 мин при температуре 60 °C** в термостате.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**. Необходимо открыть крышки до постановки в магнитный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно открыть без взмучивания сорбента.
10. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно отобрать надосадочную жидкость по внутренней стенке, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **850 мкл Раствора для отмывки Плюс**, закрыть крышки. Необходимо поставить пробирки в обычный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно плотно закрыть крышки.
12. При отсутствии магнитного штатива и термостата для пробирок объемом 5 мл каждый исследуемый образец можно разделить на две аликвоты. В таком случае порядок действий, описанный в пп. 4-11, меняется на следующий:
 - а) Из расчета использования для каждого образца двух пробирок внести в пробирки объемом 2 мл по **35 мкл подготовленной смеси ВКО**, буфера GT и магнитного сорбента.

- б) Добавить в каждую пробирку **по 1,3 мл Раствора для лизиса Плюс**.
- в) Добавить в каждую пробирку с раствором для лизиса Плюс **по 0,5 мл** исследуемых образцов сыворотки крови, спинномозговой жидкости, мочи или **по 0,25 мл** исследуемых образцов цельной венозной крови. Каждый образец добавлять в две пробирки. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.
- г) В две пробирки отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **0,5 мл ОКО**. В две пробирки положительного контроля экстракции и ОТ-ПЦР (**ПК**) внести **по 495 мкл ОКО** и **по 5 мкл ПКО РНК WNV/USUV**. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.
- д) Прогреть пробирки **10 мин при температуре 60 °С** в термостате.
- е) Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**. Необходимо открыть крышки до постановки в магнитный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно открыть без взмучивания сорбента.
- ж) Не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно отобрать надосадочную жидкость по внутренней стенке, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
- з) Добавить в пробирки **по 425 мкл Раствора для отмывки Плюс**, закрыть крышки.

ВНИМАНИЕ! При разделении на первом этапе экстракции РНК образцов на аликвоты (п. 12) на следующем этапе (п. 14) необходимо объединить аликвоты каждой пробы в одной пробирке.

- 13. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл по количеству исследуемых и контрольных образцов и промаркировать их.

14. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, перенести пробирки в обычный штатив, открыть крышки и пропипетировать. Перенести содержимое (суспензию магнетизированной силики в растворе для отмывки) в приготовленные чистые пробирки.

ВНИМАНИЕ! Магнетизированная силика не должна остаться на стенках и дне пробирки.

15. Поместить пробирки объемом 1,5 мл в магнитный штатив на 2 мин.

Необходимо открыть крышки до постановки в магнитный штатив, если в магнитном штативе их неудобно/невозможно открыть без взмучивания сорбента.

16. Открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость, как описано выше.
17. Снова добавить в пробирки по **850 мкл Раствора для отмывки Плюс**, перемешать на вортексе, затем осадить капли кратким центрифугированием.
18. Поместить пробирки в магнитный штатив на **2 мин**, затем открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость.
19. Добавить в пробирки по **600 мкл Раствора для отмывки 3**, перемешать на вортексе, затем осадить капли кратким центрифугированием.
20. Поместить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость.
21. Добавить в пробирки по **600 мкл Раствора для отмывки 4**, перемешать на вортексе, затем осадить капли кратким центрифугированием.
22. Поместить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость.
23. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 минут**.
24. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл Элюирующего буфера**.

25. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
26. Кратко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
27. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.
28. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, перенести надосадочную жидкость в новые пробирки.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – длительно. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «Магно-Сорб Экстра» вариант 50 и автоматической станции

1. **Раствор для лизиса Плюс** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Смешать в отдельной пробирке на 5 мл **ВКО IC-R1**, **Буфер GT** и **Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО IC-R1**, **30 мкл Буфера GT** и **30 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.
3. Внести в пробирки или лунки глубоколоночного планшета (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов по **70 мкл подготовленной смеси ВКО**, буфера GT и магнитного сорбента.
4. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета по **2,6 мл Раствора для лизиса Плюс**.
5. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT, магнитного сорбента и раствора для лизиса Плюс по **1 мл** исследуемых образцов сыворотки крови, спинномозговой жидкости, мочи или по **0,5 мл** исследуемых образцов цельной венозной крови, и тщательно перемешать.
6. В пробирку отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **1 мл ОКО**. В пробирку положительного контроля

экстракции и ОТ-ПЦР (ПК) внести **990 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК WNV/USUV**. Содержимое пробирок тщательно перемешать.

7. Для станции с магнитным штативом поместить на борт автоматической станции емкости с **Раствором для отмывки Плюс, Раствором для отмывки 3, Раствором для отмывки 4 и Элюирующим буфером**. Для станции с магнитными стержнями внести в лунки соответствующих глубоколоночных планшетов, размещаемых на автоматической станции, по **850 мкл Раствора для отмывки Плюс** (два планшета) по **600 мкл Раствора для отмывки 3** (один планшет), **600 мкл Раствора для отмывки 4** (один планшет) и по **100 мкл Элюирующего буфера** (один планшет).

8. Установить пробирки или планшет с исследуемыми и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктами 5 и 6, на борт автоматической станции.

Далее описана последовательность действий, запрограммированных и выполняемых на борту автоматической станции:

9. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми и контрольными образцами **при температуре 60 °С в течении 10 мин.**
10. Для станций с магнитным штативом поместить пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в магнитный штатив на **6 мин.** Для станций с магнитными стержнями опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **3 мин.**
11. Для станций с магнитным штативом удалить надсадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **850 мкл Раствора для отмывки Плюс**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с **раствором для отмывки Плюс**.
12. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.

13. Повторить пп.11-12.
14. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **600 мкл Раствора для отмывки 3**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с **раствором для отмывки 3**.
15. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.
16. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **600 мкл Раствора для отмывки 4**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с **раствором для отмывки 4**.
17. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.
18. Для станций с магнитным штативом высушить магнетизированную силику, оставив открытые пробирки на магнитном штативе в течение **10 минут**. Для станций с магнитными стержнями высушить магнетизированную силику оставив магнитные стержни с намагниченным сорбентом на открытом воздухе в течение **5 минут**.
19. Для станций с магнитным штативом добавить в каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов сыворотки крови и мочи и в пробирки положительного (ПК) и отрицательного (ОК) контролей экстракции по **100 мкл Элюирующего буфера**.
20. Для станций с магнитными стержнями поместить магнитные стержни в лунки планшета с элюирующим буфером.
Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами при температуре **60 °C** в **течении 5 мин**.

21. Для станций с магнитным штативом перенести раствор в чистые пробирки, не вынимая пробирки с магнитным сорбентом из магнитного штатива. Для станций с магнитными стержнями удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.
22. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

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

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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 WNV/USUV**, **5 мкл ОТ-ПЦР-буфера-R**, **0,5 мкл Taq полимеразы**, **0,25 мкл Ревертазы (MMiv)**. 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.

ВНИМАНИЕ! Taq полимеразу, Ревертазу (MMiv) необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси и убирать в морозильную камеру сразу же после ее добавления в реакционную смесь.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL WNV/USUV**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакцию смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL WNV/USUV, ОТ-ПЦР-буфера-R, Taq полимеразы, Ревертазы (MMIv)**, перемешать пипетированием, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
5. В каждую пробирку внести по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси утилизировать.
6. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции и ОТ-ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК WNV/USUV**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
 - в) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.

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

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5).

Таблица 5 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁴ и планшетного⁵ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	15 с	—	45
	58	30 с	FAM (Green), HEX (JOE, Yellow), ROX (Orange)	
	72	15 с	—	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции при постановке в амплификатор роторного типа. 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 или стрипы (аналогичные используемым) 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

1. Анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам в соответствии с табл. 1 настоящей инструкции.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с

⁴ например, Rotor-Gene Q (QIAGEN)

⁵ например, CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технология)

установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 6).

Таблица 6 — Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE (HEX)	ROX	
определено или отсутствует	<u>определено</u> <u>меньше</u> <u>граничного</u>	определено или отсутствует	Обнаружена РНК вируса Западного Нила
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> <u>меньше</u> <u>граничного</u>	Обнаружена РНК вируса Усуту
<u>определено</u> <u>меньше</u> <u>граничного</u>	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружена РНК вирусов Западного Нила и Усуту
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	определено 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. 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 амплификации кДНК в соответствии с табл. 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 7 — Контроль достоверности этапов экстракции РНК, обратной транскрипции и амплификация с детекцией в режиме «реального времени»

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров JOE(HEX) и ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов (начиная с этапа экстракции РНК).
2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM и/или JOE(HEX) и/или ROX. 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.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора JOE(HEX) и/или JOE(HEX)/ROX. 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, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение

порогового цикла (Ct), 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 (параметрах базовой линии), требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование.

Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих холодоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1.

Комплект реагентов «**РИБО-преп Экстра**» вариант 50 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе **ПКО РНК WNV/USUV**, **ВКО IC-R1** и **ОКО** хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«**ПЦР-комплект**» вариант FRT-50 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент **К**- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

ПЦР-смесь-FL WNV/USUV хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты **«ПЦР-комплекта»** вариант FRT-50 F **не более 3 раз**.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Форма 2.

Комплект реагентов **«Магно-Сорб Экстра»** вариант 50 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе **ПКО РНК WNV/USUV, ВКО IC-R1 и ОКО** хранить при температуре **от плюс 2 до плюс 8 °С**.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в морозильной камере при температуре **от минус 24 до минус 16 °С**.

Реагент **К**- допустимо хранить при температуре **от минус 24 до плюс 8 °С**.

ПЦР-смесь-FL WNV/USUV хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 2 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты **«ПЦР-комплекта»** вариант FRT-50 F **не более 3 раз**.

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 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1, e-mail: promlab@cspfmmba.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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Руководитель
производственной лаборатории



Ж.Е.Тарасова

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



Знаки опасности