

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор центра постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

«23» Август 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК
вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита
методом полимеразной цепной реакции
«АмплиТест® Детские вирусы»



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

IVD

Оглавление

Список сокращений	3
Назначение	3
Принцип метода.....	5
Комплектация	6
Состав	7
Аналитические характеристики.....	8
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	9
Воспроизводимость.....	11
Меры предосторожности и сведения об утилизации	11
Дополнительные материалы и оборудование	15
Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала	17
Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК.....	19
Проведение ПЦР-исследования	19
Экстракция РНК из исследуемых образцов	19
Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени»	21
А. Подготовка проб для амплификации	21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	23
В. Анализ и интерпретация результатов	24
Срок годности. условия транспортирования и хранения	27
Гарантийные обязательства изготовителя.....	28
Символы, используемые в печатной продукции.....	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
НК	- нуклеиновые кислоты
ПК	- положительный контроль экстракции РНК, обратной транскрипции и ПЦР, включает фрагменты РНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита
К-	- отрицательный контроль ПЦР, не содержит фрагменты РНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и ПЦР-амплификация
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 11 ПКО РНК Msl	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК вируса кори
СОП № 25 ПКО РНК Rub	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК вируса краснухи
СОП № 30 ПКО РНК Mps	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК вируса эпидемического паротита
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ТСID50/мл, ТЦД50/мл	- тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50 % клеток монослоя
LD50/мл, ЛД50/мл	-средняя летальная доза, вызывающая гибель 50 % животных

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® Детские вирусы» (далее – набор реагентов «АмплиТест® Детские вирусы», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиТест® Детские вирусы» предназначен для качественного определения РНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита в биологическом материале человека (мазках со слизистой носо- и ротоглотки, плазме крови) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – диагностика кори, краснухи и эпидемического паротита.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление РНК возбудителей инфекций кори, краснухи и эпидемического паротита методом ПЦР проводится пациентам всех возрастных групп с клинической симптоматикой вышеуказанных инфекций, при подозрении на инфекцию, вызванную перечисленными патогенами, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицами.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на детские карантинные инфекции вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в том числе при вспышках данных инфекций 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.

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»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), с проведением на следующем этапе исследования 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 ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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 Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического про-

дукта 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 4 реакции ОТ-ПЦР – амплификация кДНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации регистрируются по 4 различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 – Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM	JOE(HEX)	ROX	Sy5
кДНК-мишень	ВКО IC-R1	вирус краснухи	вирус паротита	вирус кори
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена E1	фрагмент гена NP	фрагмент гена N

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации и включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Набор реагентов предназначен для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Набор реагентов рассчитан на проведение 50 определений, включая контроли.

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® Детские вирусы»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

Состав

«РИБО-преп» 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 сероголубого цвета ¹	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

К комплекту реагентов «РИБО-преп» вариант 50 прилагаются контрольные образцы этапов экстракции РНК/ДНК из биологического материала и ОТ-ПЦР:

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 MMR	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

«РИБО-преп» вариант 50 рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли.

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита в режиме «реального времени», включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MMR	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Тақ 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 проведение 50 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 50 тестов), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® Детские вирусы»

Вид исследуемого материала	Экстракция	Комплект для ОТ-ПЦР	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³
Плазма крови			

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК штаммов следующих микроорганизмов: штаммов «Mvi/Moscow.Rus/05.99 ГKB2360» вируса кори (1×10^5 TCID₅₀/мл), «Орлов ГKB1707» вируса краснухи ($0,5 \times 10^4$ TCID₅₀/мл), «Драгун-1 ГKB2353» вируса эпидемического паротита (5×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 1 «Faroun T10 ГKB171 (1×10^5 TCID₅₀/мл), из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского; штаммов вируса гриппа А (H2N3) (А/Утка/Германия-1215/73) ($1 \times 10^{5,5}$ LD₅₀/мл), вируса простого герпеса I типа «248/Ленинград/88», риновируса человека ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), аденовируса человека 1 типа (1×10^3 TCID₅₀/мл) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им А.С.Смородинцева (1×10^6 TCID₅₀/мл); штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 из коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России ($1,3 \times 10^7$ копий/мл).

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 кори, краснухи, эпидемического паротита 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».

Для изучения влияния интерферирующих веществ на полученные результаты испытуемым набором реагентов, были протестированы заведомо положительные и заведомо отрицательные клинические образцы мазков со слизистой носо- и ротоглотки и плазмы крови с добавлением и без добавления эндогенных (муцин, гемоглобин, билирубин, триглицериды, альбумин) и экзогенных (лидокаин, дексаметазон, хлоргексидина биглюконат, новокаин, гепарин) интерферентов, которые могут присутствовать в биологическом материале.

Вычисляли разницу полученных средних значений Ct (ΔCt_{cp}) между контрольными (без внесения интерферентов) и испытуемыми образцами. Критерием отсутствия влияния интерферирующих веществ являлось качественное совпадение результатов для образцов до внесения интерферентов и после (положительные/отрицательные образцы), а также результат, выраженный как ΔCt_{cp} , не более 1,5 циклов.

Результаты тестирования представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Оценка влияния интерферирующих веществ

Биологический материал	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мазки	Эндогенные вещества	Муцин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Лидокаин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Дексаметазон	1,53 ммоль/л	Не обнаружено
		Водный раствор хлоргексидина биглюконата, 0,05 %	51,4 ммоль/л	Не обнаружено
		Новокаин, раствор, 5 мг/мл	1 % (v/v)	Не обнаружено
Плазма 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
	Экзогенные вещества	Гепарин	5 МЕ/мл	Не обнаружено

Биологический материал	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
		Новокаин, раствор, 5 мг/мл	1 % (v/v)	Не обнаружено

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования (с учетом повторяемости) была 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 5.

Таблица 5. Таблица диагностических характеристик набора реагентов «АмплиТест® Детские вирусы»

Показатель	Тип используемых образцов биологического материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
РНК вируса кори	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	92,89-100 %	96,38-100 %
	Плазма крови	91,19-100 %	95,75-100 %
РНК вируса краснухи	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,28-100 %	97,09-100 %
	Плазма крови	86,28-100 %	96,38-100 %
РНК вируса эпидемического паротита	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	92,89-100 %	96,38-100 %
	Плазма крови	90,00-100 %	95,98-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней должно 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». 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:

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

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

- 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, упаковку², 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 работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

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

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

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и прави-

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

лам работы в клинико-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. Среда для хранения и транспортировки респираторных мазков «АмплиТест® ТСП» (РУ № РЗН 2022/16719, производства ФГБУ ЦСП, Россия).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.», Испания).
3. Пробирки вакуумные для гематологии с 3 % раствором ЭДТА (например, ApexLab, Россия).

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
3. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).

2. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
5. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axugen», США).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Axugen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axugen», США).
10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axugen», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – при использовании прибора планшетного типа;
- 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, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
 6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
 7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX50 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).
 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

Для исследования от пациента рекомендуется брать следующий биологический материал:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки.
- плазма крови

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

Мазки со слизистой нижнего носового хода

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Для взятия мазков используют сухие стерильные зонды из полистирола с вязкими тампонами. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5–6 см). После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышечкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Мазки с задней стенки ротоглотки

Образцы берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышечкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют. Допускается хранение материала до проведения исследова-

дования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре не выше минус 16 °С – не более 7 суток, при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

Плазма крови

Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 г и переносят плазму в новую пробирку. Отобрать плазму следует не позднее 6 ч с момента взятия крови.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Мазки со слизистой носо- и ротоглотки

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

Плазма крови

Использовать без предварительной обработки. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре не выше минус 16 °С – не более 7 суток, при температуре не выше минус 68 °С - длительно. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридационно-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».

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 по 10 мкл ВКО IC-R1. Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО IC-R1, внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО РНК MMR.
4. 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 65°С в термостате.
5. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переверачивая 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 переверачивать штатив.
9. Центрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4,

- плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
 13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.
 14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
 15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 90 мкл.
 16. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

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 MMR**, **5 мкл 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.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL MMR**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL MMR**, **ОТ-ПЦР-буфера-R**, **Taq полимеразы**, **Ревертазы (MMiv)**, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В подготовленные пробирки 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.

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

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

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

Б. Проведение 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. 6).

Таблица 6 – Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного³ и планшетного⁴ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	15 с	-	45
	60	30 с	FAM, JOE(HEX), ROX, Cy5	
	72	15 с	-	

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 или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

³ Rotor-Gene Q (QIAGEN)

⁴ CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия)

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

В. Анализ и интерпретация результатов

- 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 4 каналам в соответствии с таблицей 1 настоящей инструкции.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 7).

Таблица 7 – Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора				Результат
FAM	JOE(HEX)	ROX	Cy5	
определено или отсутствует	<u>определено меньше граничного</u>	отсутствует	отсутствует	Обнаружена РНК вируса краснухи, Не обнаружена РНК вирусов эпидемического паротита, кори
определено или отсутствует	отсутствует	<u>определено меньше граничного</u>	отсутствует	Обнаружена РНК вируса эпидемического паротита, Не обнаружена РНК вирусов краснухи, кори
определено или отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено меньше граничного</u>	Обнаружена РНК вируса кори, Не обнаружена РНК вирусов краснухи, эпидемического паротита,
<u>определено меньше граничного</u>	отсутствует	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружена РНК вирусов краснухи, эпидемического паротита, кори
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				Результат
FAM	JOE(HEX)	ROX	Sy5	
определено меньше граничного	Для одного или нескольких флуорофоров (JOE(HEX), ROX или Sy5) определено Ct 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 Ct 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. 8 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 8 – Контроль достоверности этапов экстракции РНК, обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE(HEX)	ROX	Sy5
ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	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), ROX, Cy5 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 и/или Cy5. 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 ROX и/или Cy5. 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 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

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

Хранение.

«ПЦР-комплект» хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

ПЦР-смесь-FL MMR хранить в защищенном от света месте.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты «ПЦР-комплекта» не более 3 раз.

Комплект «РИБО-преп» и контрольные образцы хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

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@cspfmba.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 регулирующую 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! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Беречь от влаги



Знаки опасности