«УТВЕРЖДАЮ»
Директор центра постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)
_____ Г.А. Шипулин
«28» ____ 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест® Influenza A H5/H7/H9/H10»

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

IVD

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАИМЕНОВАНИЕ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 4
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ 4
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ 5
ПРИНЦИП МЕТОДА 6
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА 7
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 18
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК 19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 20
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 20
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 22
А. Подготовка проб для амплификации 22
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 24
В. Анализ и интерпретация результатов 25
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 30
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ 31
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ГА	- гемагглютинирующая активность
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК-мишени (1 копия), содержащейся в 1 геноме вируса
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К–	- отрицательный контроль ПЦР, не содержит фрагменты РНК вируса гриппа А
НК	- нуклеиновые кислоты
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и ПЦР-амплификация
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец (реагент)
ПКО РНК H5/H7/H9	- положительный контроль экстракции РНК, обратной транскрипции и ПЦР, включает фрагменты РНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9
ПКО РНК H10/M	- положительный контроль экстракции РНК, обратной транскрипции и ПЦР, включает РНК вируса гриппа А (М ген) и РНК вируса гриппа А субтипа H10
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарно-эпидемиологические правила и нормы
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»
TCID50/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 и дифференциации РНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® Influenza A H5/H7/H9/H10» (далее – набор реагентов «АмплиТест® Influenza A H5/H7/H9/H10», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для качественного определения РНК вируса гриппа А и типирования субтипов H5, H7,

H9, H10 в биологическом материале человека (мазках со слизистой носо- и ротоглотки, мокроте) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – для диагностики *in vitro*, а именно для выявления РНК вируса гриппа А с идентификацией потенциально опасных для человека субтипов H5, H7, H9, H10 гриппа А.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление РНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 методом ПЦР проводится пациентам всех возрастных групп с клинической симптоматикой вышеуказанной инфекции, при подозрении на инфекции, вызванные высокопатогенными субтипами гриппа А, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактным лицам.

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 высокопатогенный грипп А, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в том числе при вспышках данной инфекции 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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

СВЕДЕНИЯ ОБ АНАЛИТАХ

Набор реагентов для качественного определения РНК вируса гриппа А и типирования субтипов H5, H7, H9, H10 в биологическом материале человека разработан в связи с беспрецедентными вспышками заболевания птиц и млекопитающих, вызванными высокопатогенным вирусом гриппа А субтипа H5 генетической клады 2.3.4.4b в 2022-2024 гг., а также регулярными единичными случаями инфицирования человека другими субтипами высокопатогенного гриппа птиц. По данным ВОЗ, с января 2003 года по февраль 2024 года зафиксировано около 887 случаев заражения людей высокопатогенным гриппом птиц H5N1, из которых около 52 % (462 случая) – со смертельным исходом. Большинство случаев выявлено у людей, которые имели контакт с больной или мертвой птицей на производстве, а также в природной среде. В январе 2024 года в Китае зафиксирован случай коинфекции человека вирусом сезонного гриппа подтипа A(H3N2) и птичьего гриппа подтипа A(H10N5) с летальным исходом.

Возникновение новых высокопатогенных штаммов вируса гриппа А, способных к эффективной передаче от человека к человеку, является весьма вероятным. Как утверждает Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA), если вирус гриппа птиц начнет эффективно передаваться от человека к человеку, это приведет к крупномасштабной пандемии с высокой смертностью, так как у людей отсутствует иммунитет к этой инфекции.

Чтобы быть готовым к этой пандемии, разработано средство диагностики и типирования вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 в биологическом материале человека.

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 одновременной амплификации участков кДНК вируса гриппа А, а также типирование субтипов H5, H7, H9, H10 вируса гриппа А 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 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 4 реакции ОТ-ПЦР для ПЦР-смеси-FL H5/H7/H9 – реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Для ПЦР- смеси-FL H10/M в одной пробирке проводятся 3 реакции ОТ-ПЦР – реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК вируса гриппа А (М ген), кДНК вируса гриппа А субтипа H10, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1.

Результаты амплификации регистрируются по 4 различным каналам флуоресцентной детекции для ПЦР-смеси-FL H5/H7/H9 и по 3 различным каналам флуоресцентной детекции для ПЦР-смеси-FL H10/M (см. табл.1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Наименование ПЦР-смеси-FL	Канал для флуорофора	FAM	JOE (HEX)	ROX	Cy5
H5/H7/H9	кДНК-мишень	ВКО IC-R1	кДНК вируса гриппа А субтипа H5	кДНК вируса гриппа А субтипа H7	кДНК вируса гриппа А субтипа H9
	Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена НА	фрагмент гена НА	фрагмент гена НА
H10/M	кДНК-мишень	ВКО IC-R1	кДНК вируса гриппа А субтипа H10	кДНК вируса гриппа А	-
	Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена НА	фрагмент гена М	-

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ НАБОРА

Набор реагентов выпускается в одной форме комплектации и включает:

- **«РИБО-преп» вариант 50** – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала. Рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли.

- **«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 в режиме «реального времени».

Набор реагентов предназначен для выполнения полного ОТ-ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификацию участка кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», что позволяет определять РНК вируса гриппа А и типировать субтипы H5, H7, H9, H10 вируса гриппа А в качественном формате.

Набор реагентов «АмплиТест® Influenza A H5/H7/H9/H10» рассчитан на проведение 50 определений, включая контроли (100 реакций амплификации).

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® Influenza A H5/H7/H9/H10»;
- 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 серо-голубого 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 H5/H7/H9	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО РНК H10/M	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 в режиме «реального времени» включает:

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL H5/H7/H9	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL H10/M	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Taq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 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® Influenza A H5/H7/H9/ H10»

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

*образцы после соответствующей предварительной обработки

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

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК штаммов вируса гриппа А (H1N1) pdm (А/С.-Петербург/НИИГ-94/20) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H2N3) (А/Утка/Германия-1215/73) ($1x10^{5,5}$ LD50/мл), вируса гриппа А

(H3N2) (A/Красноярск/НИИГ-20/21) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (A/Скворец/233/07/1/2011) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (A/NIBRG/14) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N3) (A/duck/Moscow/4971/13) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H7N3) (A/Mallard/NT/12/2002) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N7) (A/Equine/Corbora/5/1976) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N9) (A/Anhui/1/2013) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (A/HK/1073/1999) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (A/Чирок/Колотун/Приморье/3628/2002) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H10N5) (A/mallard/Dagestan/004/2018) (1:32 ГА), вируса гриппа В (B/C. Петербург/НИИГ-183/2020), вируса гриппа С (C/Taylor/1233/1947), риновируса человека тип 1А (1А/Ленинград НИИГ/1976) ($2{,}16 \times 10^7$ ГЭ/мл) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им А.С. Смородинцева; вируса кори «Mvi/Moscow.Rus/05.99 ГКВ2360» (1×10^5 TCID50/мл), вируса краснухи «Орлов ГКВ1707» ($0{,}5 \times 10^4$ TCID50/мл), вируса эпидемического паротита «Драгун-1 ГКВ2353» (5×10^6 TCID50/мл) из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского; коронавируса *Human coronavirus* 229E (ATCC® RV-740TM); а также ДНК штаммов *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenza* ATCC 49766 из рабочей коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* ATCC 700603 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с титром не менее 1×10^7 КОЕ/мл.

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 вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9, H10 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 IC-R1, 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 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 мокроты с добавлением и без добавления эндогенных (муцин, гемоглобин) и экзогенных (лидокаин, дексаметазон, хлоргексидина биглюконат, новокаин) интерферентов, которые могут присутствовать в биологическом материале.

Вычисляли разницу полученных средних значений *Ct* (ΔCtср.) 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 ΔCtср, 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, мокрота*	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

*образцы после соответствующей предварительной обработки

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 набора реагентов «АмплиТест® Influenza A H5/H7/H9/H10»

Показатель	Тип используемых образцов биологического материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
РНК вируса гриппа А	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	97,09-100 %	92,60-100 %
	Мокрота	97,09-100 %	92,13-100 %
РНК вируса гриппа А субтип Н5	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,28-100 %	97,54-100 %
	Мокрота	86,28-100 %	97,49-100 %
РНК вируса гриппа А субтип Н7	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,28-100 %	97,54-100 %
	Мокрота	86,28-100 %	97,49-100 %
РНК вируса гриппа А субтип Н9	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,28-100 %	97,54-100 %
	Мокрота	86,28-100 %	97,49-100 %
РНК вируса гриппа А субтип Н10	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,28-100 %	97,54-100 %
	Мокрота	86,28-100 %	97,49-100 %

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». Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методи-

ческими 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

---

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

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 правилам 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 образ-

цами 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® ТСР» (производства ФГБУ «ЦСП», Россия, РУ № РЗН 2022/16719).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб.
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный.

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты.

2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся или завинчивающиеся пробирки с крышками объемом 1,5 - 2,0 мл.
3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл.
4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл.
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
6. Микроцентрифуга-вортекс.
7. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл.
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. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
2. Микроцентрифуга-вортекс.
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g.
5. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл.
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100, до 200 и до 1000 мкл.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл.

10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл.
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 гибридизационно-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, 100, 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 4 независимых каналов флуоресцентной детекции (FAM, HEX, ROX, Cy5), зарегистрированный в РФ и удовлетворяющий следующим требованиям:
   - для приборов планшетного типа наличие подогреваемой

крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры не более ±0,4 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

Клинические испытания проведены с использованием следующих приборов: прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот С1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), амплификатор детектирующий «ДТпрайм» (РУ № ФСР 2011/10229).

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:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки;
- мокрота.

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 вискозными 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 вискозным тампоном) помещают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой 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 вискозными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вискозным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют. Допускается хранение материала до проведения исследования 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.

Мокрота

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут. при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

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.

Мокрота

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с мокротой добавляется реагент «МУКОЛИЗИН» в соотношении объемов 2:1 (ориентируясь по градуировке емкости). При необходимости увеличивают объем реагент «МУКОЛИЗИН» до соотношения 5:1. После инкубации при комнатной температуре до просветления мокроты (не более 20 минут) 100 мкл мокроты используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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 кон-

троля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля выделения H5/H7/H9 (**ПК H5/H7/H9**) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК H5/H7/H9**, в пробирку положительного контроля выделения H10/M (**ПК H10/M**) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК H10/M**.

4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при температуре 65°C** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g).**
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.
8. 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.
9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g).** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 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 (11,5 тыс g).** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C 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 (11,5 тыс g).** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК/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 H5/H7/H9 или ПЦР-смеси-FL H10/M, 5 мкл ОТ-ПЦР-буфера-R, 0,5 мкл Taq полимеразы, 0,25 мкл Ревертазы (MMlv)**. Каждую реакционную смесь готовят 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 (MMlv) необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси и убирать в морозильную камеру сразу же после ее добавления в реакционную смесь.

2. Разморозить пробирки с **ПЦР-смесью-FL H5/H7/H9 и ПЦР-смесью-FL H10/M**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
   В двух отдельных пробирках подготовить реакционные смеси. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL H5/H7/H9** или **ПЦР-смеси-FL H10/M**, **ОТ-ПЦР-буфера-R**, **Taq полимеразы**, **Ревертазы (MMlv)**, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб, рекомендуется расставить в два ряда.
4. В каждый ряд пробирок внести по одной из двух приготовленных реакционных смесей по **15 мкл** на пробу. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В подготовленные пробирки с различными реакционными смесям 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 H5/H7/H9 (ПК H5/H7/H9) – в пробирку с реакционной смесью **ПЦР-смесь-FL H5/H7/H9** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК H5/H7/H9.**
   б) Положительный контроль экстракции РНК и ОТ-ПЦР H10/M (ПК H10/M) – в пробирку с реакционной смесью **ПЦР-смесь-FL H10/M** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК H10/M**.
   в) отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-) – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К–.**

г) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **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. 5).

Таблица 5 – Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[3] и планшетного[4] 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. Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции для пробирки с ПЦР-смесью-FL H5/H7/H9. 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] Rotor-Gene Q (QIAGEN)

[4] CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм («ДНК-Технология»), QuantStudio 5 (Life Technologies)

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 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 (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 6).

Таблица 6 — Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (*Ct*) по каналу для флуорофора							Результат
ПЦР-смесь-FL H5/H7/H9				ПЦР-смесь-FL H10/M			
FAM	JOE (HEX)	ROX	Cy5	FAM	JOE (HEX)	ROX	
определено или отсутствует	определено меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено меньше граничного	**Обнаружена** РНК вируса гриппа А субтипа H5
определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено меньше граничного	**Обнаружена** РНК вируса гриппа А субтипа H7
определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено меньше граничного	**Обнаружена** РНК вируса гриппа А субтипа H9
определено меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует*	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено меньше граничного	определено меньше граничного	**Обнаружена** РНК вируса гриппа А субтипа H10*
определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено или отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	**Обнаружена** РНК вируса гриппа А **НЕ обнаружена** РНК вируса гриппа субтипов H5, H7, H9, H10
определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	**НЕ обнаружена** РНК вируса гриппа А
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	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
ПЦР-смесь-FL H5/H7/H9				ПЦР-смесь-FL H10/M			
FAM	JOE (HEX)	ROX	Cy5	FAM	JOE (HEX)	ROX	
определено меньше граничного	Для одного или нескольких флуорофоров (JOE, ROX или Cy5) определено *Ct* больше граничного			определено меньше граничного	Для одного или нескольких флуорофоров (JOE, ROX) определено *Ct* больше граничного. Или для флуорофора ROX не определено *Ct* при определении *Ct* для флуорофора JOE или флуорофоров (JOE, ROX, Cy5) на смеси ПЦР-смесь-FL **H5/H7/H9.**		**Сомнительный*** **

* При обнаружении РНК вируса гриппа А субтипа H10 **возможно появление сигнала по каналу ROX** для ПЦР-смеси-FL H5/H7/H9 на поздних циклах. В случаях если разница пороговых циклов по каналу JOE (HEX) для ПЦР-смеси-FL H10/M и по каналу ROX для ПЦР-смеси-FL H5/H7/H9 превышает 10 циклов, результат интерпретируется как «**Обнаружена** РНК вируса гриппа А субтипа H10, **НЕ обнаружена** РНК вируса гриппа А субтипа H7».

** 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. 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

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

Смесь	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (*Ct*) по каналу для флуорофора			
			FAM	JOE	ROX	Cy5
ПЦР-смесь-FL H5/H7/H9	ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного
	ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
	К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
ПЦР-смесь-FL H10/M	ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	Не учитывается
	ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	Не учитывается
	К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	Не учитывается

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM, 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 плюс 2 до плюс 8 °С не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

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

Хранение.

«ПЦР-комплект» 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 H5/H7/H9 и ПЦР-смесь-FL H10/M 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



Код партии



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Дата изменения



Температурный диапазон



Изготовитель



Знаки опасности



Осторожно



Содержимого достаточно для проведения <*n*> тестов



Использовать до



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



Не допускать воздействия солнечного света



Дата изготовления