

КОПИЯ

УТВЕРЖДАЮ



Генеральный директор

ФГБУН ГИИ ВБ "Вектор"

Российского надзора

А.А. Максютлов

ноября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления
гДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 на
олигонуклеотидных суспензионных биочипах
«Вектор-хMAP-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9»
по ТУ 21.20.23-081-05664012-2017

Вектор-хMAP-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Полное название набора

Набор реагентов для выявления кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 на олигонуклеотидных суспензионных биочипах «Вектор-хMAP-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» по ТУ 21.20.23-081-05664012-2017.

1.2. Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Вектор-хMAP-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» предназначен для выявления кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9, предварительно синтезированных на матрице РНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 в реакции обратной транскрипции с дальнейшей гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации на олигонуклеотидных суспензионных биочипах, с использованием мультиплексного проточного анализатора Luminex 200 (Luminex, США) или аналогичных приборах других производителей.

Диагностическая роль набора реагентов «Вектор-хMAP-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» заключается в возможности его использования для ранней диагностики гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 и индикации патогенных биологических агентов (ПБА); как ускоренного предварительного теста при выполнении культурального и биологического методов исследования и идентификации подозрительных культур; для эпидемиологического мониторинга.

1.3. Область применения набора

Область применения набора — клиническая лабораторная диагностика вируса гриппа, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования.

Набор реагентов может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, вирусологических лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (без накопления возбудителя вирусологическими методами), в эпидемиологических службах, имеющих

Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных II-IV групп патогенности для дифференцированной диагностики субтипов вируса гриппа А, а также, в стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности¹.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «Вектор-хMAP-Influenza H1/H3/H5/H7/H9» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов состоит из 6 реагентов.

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мл)	Кол-во
1.	Реагент-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,50	1 пробирка
2.	Реагент-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,50	1 пробирка
3.	Реагент-3	суспензия полистирольных микросфер	0,25	1 пробирка
4.	Положительный контрольный образец, ПКО-Н1/Н3/Н5	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО-Н7/Н9	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка
6.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка

В состав набора входит эксплуатационная документация: инструкция по применению набора.

¹ В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Реагент-1 расфасован по 500 мкл в микропробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,0-2,0 мл. Состав: 10хПЦР-буфер; 5 мМ дНТФ – водный раствор дезоксирибонуклеозид-трифосфатов; 100 мМ $MgCl_2$; 5 пар праймеров.

Реагент-2 расфасован по 500 мкл в микропробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,0-2,0 мл. Состав: 10хПЦР-буфер; Smart Taq ДНК-полимераза.

Реагент-3 расфасован по 250 мкл в микропробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,0-2,0 мл. Состав: суспензия полистирольных микросфер 5 цветовых регионов с иммобилизованными на поверхности вирусспецифическими ДНК-зондами, 1,5×ТМАС.

Положительный контрольный образец ПКО-Н1/Н3/Н5 расфасован по 200 мкл в микропробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,0-2,0 мл. Состав: раствор трех рекомбинантных бактериальных плазмид в ТЕ-буфере, содержащих вставки ДНК, комплементарные участкам генома вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3 и Н5.

Положительный контрольный образец ПКО-Н7/Н9 расфасован по 200 мкл в микропробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,0-2,0 мл. Состав: раствор двух рекомбинантных бактериальных плазмид в ТЕ-буфере, содержащих вставки ДНК, комплементарные участкам генома вируса гриппа типа А субтипов Н7 и Н9.

Отрицательный контрольный образец расфасован по 200 мкл в микропробирку с закручивающейся крышкой объемом 1,0-2,0 мл. Состав: деионизованная вода.

Набор реагентов упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой. Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку. В этом случае пакет и инструкцию по применению вкладывают в коробку.

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой

которых для конечного пользователя является температура отжига, составляющая 50 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2. Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на проведение 50 определений, включая контроли.

2.3. Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 основано на использовании метода обратной транскрипции, ПЦР и дальнейшей гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации на олигонуклеотидных суспензионных биочипах. Метод основан на многократном увеличении числа копий фрагмента вирусных нуклеиновых кислот (комплементарной ДНК – кДНК), что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации. Для детекции продуктов амплификации применяются вирусспецифические ДНК-зонды, иммобилизованные на поверхности окрашенных полистирольных микросфер пяти цветовых регионов. Наличие флуоресценции микросфер заданного региона соответствует наличию в реакционной смеси специфических продуктов амплификации.

2.3. Ограничения метода

В инфицированном материале кДНК вирусов может быть не обнаружена по причине ингибирования обратной транскрипции, ПЦР и/или недостаточной эффективности выделения нуклеиновых кислот. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения НК либо проведения реакций ОТ, ПЦР.

Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ОТ-ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ОТ-ПЦР и/или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью положительных контрольных образцов ОТ-ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области) и в испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех исследуемых образцов.

3.1.1. Аналитическая чувствительность

Набор реагентов должен выявлять в реакционной смеси 1×10^4 копий кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9.

3.1.2. Специфичность

Набор реагентов не должен давать положительных результатов с образцами здоровых доноров или образцами, содержащими генетический материал гетерологичных вирусов (полиовирус Sabin, аденовирус 5 типа, вирус Повассан, вирус денге 1, вирус Коксаки (Coxsackievirus A7)).

3.2. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области) и в испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва) в

рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

При проведении исследований наблюдалась полная внутримышечная, межмышечная и межсерийная воспроизводимость для всех исследуемых образцов.

3.2.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %. При исследовании 200 положительных образцов, содержащих кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 в концентрации $1,0 \times 10^4$ копий кДНК в 30 мкл реакционной смеси, положительный результат в ПЦР получен для 200 образцов.

3.2.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

При исследовании 200 отрицательных образцов, содержащих НК гетерологичных микроорганизмов отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 100 % случаях.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Вирус гриппа типа А субтипов Н1 и Н3 относится к III группе патогенности. Работа с вирусом гриппа типа А должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I -

IV групп патогенности», СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

В случае подозрения на высокопатогенный вирус гриппа (А/Н5Nx, А/Н7Nx, А/Н9Nx), который относится ко II группе патогенности (СП 1.3.3118-13) все работы по отбору проб от больных для лабораторного исследования осуществляют в соответствии с Письмом Роспотребнадзора от 26.09.2017 № 01/12890-17-32 «О направлении рекомендаций по отбору проб на респираторные вирусы. Взятие и хранение материала для исследования на возбудители гриппа, ОРВИ, ОРЗ методом ПЦР» и МУК 4.2.2136—06 «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей: Методические указания», в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные.
- Инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала 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».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных

работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1. Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп патогенности, не имеющих противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3. Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4. Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1. Рекомендуемое измерительное оборудование

Мультиплексный проточный анализатор Luminex 200 (Luminex, США) с использованием компьютера с установленным программным обеспечением Bio-Plex Manager 6.0. и в соответствии с инструкцией к прибору Luminex 200 или аналогичные приборы других производителей;

Приборы должны быть зарегистрированы в РФ как медицинское изделие.

5.2. Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3. Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл и на 20-200 мкл.

5.4. Другое используемое оборудование

ПЦР-бокс (БАВ-ПЦР «Ламинар-с» («Ламинарные системы», Россия) или аналогичный другого производителя);

Центрифуга для микропробирок до 12000 об/мин;

Встряхиватель пробирок «Вортекс»;

Амплификатор Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) с программным обеспечением или аналогичный другого производителя;

Ультразвуковая ванна;

Центрифуга для серологических планшетов;

Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

Холодильник на 2-8 °С.

5.5. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

Наконечники с аэрозольным барьером.

5.6. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Набор реагентов для выделения РНК (например, «Рибо-сорб» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) или аналогичные наборы реагентов других производителей);

Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (например, «Реверта-L» ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) или аналогичные наборы реагентов других производителей);

Очищенная вода;

Раствор тетраметиламмония хлорида ТМАС 5М (Sigma);

Раствор Саркозила 20 %;

Раствор Tris-HCl 1М, pH 8,0;

Раствор EDTA 0,5М, pH 8,0;

1×TE – 1-кратный TE-буфер: водный раствор 1мМ Tris-HCl (pH 7,5); 1мМ ЭДТА;

Раствор репортерного красителя стрептавидин-R-фикоэритрина, концентрация 1 мг/мл (Invitrogen).

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

Отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

Комплект средств для обработки рабочего места.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность вирусом гриппа типа А не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-хМАР-Influenza H1/H3/H5/H7/H9».

6.1. Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: мокроты, мазков и смывов из полости носа и ротоглотки, вируссодержащей суспензии, аутопсийного материала.

6.2. Процедура получения биологического материала

Процедура взятия проб должна выполняться в соответствии с правилами противоэпидемического режима: работа в защитной одежде, маске, очках и перчатках, соблюдение мер личной и общественной безопасности и др. (см. МУК 4.2.2136—06 «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей»).

В качестве проб для диагностического исследования используют:

- мазки из полости носа и ротоглотки;
- смывы из полости носа и ротоглотки;
- в случае смерти кусочки органов умерших (фрагменты пораженной части трахеи/бронхов/легких).

Взятие материала для исследования производят при первом обращении пациента, но не позднее 7 дней от появления симптомов гриппа/ОРВИ.

Сразу после взятия пробы пробирки маркируют, указывая фамилию и инициалы больного, возраст, день болезни, вид материала и дату его взятия. Остальные сведения о больном (предполагаемый диагноз, дату поступления, вакцинный статус и пр. указывают в сопроводительной.

После завершения сбора образцов от больного (больных) все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Выделение РНК из клинических образцов осуществляют при соблюдении требований МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Работа по выполнению стадии выделения РНК проводится в BSL-3 с использованием наборов реагентов для выделения РНК вируса из клинических образцов и секционного материала, например, «Рибо-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) или аналогичных, в соответствии с инструкциями производителей наборов.

6.3. Ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения РНК используют зарегистрированные наборы реагентов. Для достижения показателей аналитической чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл. Для получения кДНК используют зарегистрированные наборы реагентов и полученный препарат РНК. Полученную кДНК используют для проведения анализа с помощью набора реагентов «Вектор-хMAP-Influenza H1/H3/H5/H7/H9».

6.4. Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят

при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследуемые пробы хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С не более одного месяца, при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года, не допуская его оттаивания до проведения исследования.

При замораживании клинического материала его транспортировка также должна проводиться в замороженном состоянии. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов.

6.5. Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса гриппа типа А, должны осуществляться в соответствии с действующими СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10) и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

7.1. Процедура приготовления образцов

7.1.1. Приготовление реакционной смеси: в отдельной микропробирке объемом 1,5 мл готовят смесь компонентов следующего состава (из расчета на одну пробу):

Реагент-1 10 мкл

Реагент-2 10 мкл

Смесь перемешивают пипетированием. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объёма: 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл.

7.2. Разведение препарата кДНК (при необходимости)

Образцы кДНК, полученные в реакции обратной транскрипции, разбавляют равным объемом деионизованной воды (деионизованная вода не поставляется) или, в случае использования наборов «Реверта-L», ДНК-буфером, как это указано в инструкции к набору «Реверта-L» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

Реагент-1 10 мкл

Реагент-2 10 мкл

Реагент-3 5 мкл

На каждый анализ расходуются:

- 10 мкл ПКО-Н1/Н3/Н5;

- 10 мкл ПКО-Н7/Н9;

- 10 мкл ОКО;

8.2. Последовательность проведения этапов анализа

8.2.1. ПЦР амплификация

Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника. Перед использованием встряхивают пробирки с реагентами на микроцентрифуге-вортекс в течение 5 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ и осаждают капли на дно пробирки кратковременным центрифугированием.

Для проведения амплификации используют прозрачные микропробирки объемом 0,2 мл в соответствии с количеством исследуемых образцов.

Помещают микропробирки в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки.

Готовят реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешивают в отдельной пробирке (из расчета на одну пробу):

Реагент-1	10 мкл
-----------	--------

Реагент-2	10 мкл
-----------	--------

Открывают крышки микропробирок и вносят в них по 20 мкл реакционной смеси.

Используя наконечники с аэрозольным барьером, в микропробирки последовательно вносят соответственно порядку исследования образцов по 10 мкл ОКО, и далее по 10 мкл растворов исследуемых образцов, закрывают крышки данных микропробирок.

Вносят (в последнюю очередь) по 10 мкл ПКО-Н1/Н3/Н5, ПКО-Н7/Н9 в микропробирки соответственно маркировке, закрывают крышки данных микропробирок.

- Общий (конечный) объем реакционной смеси в каждой пробирке должен составить 30 мкл.

- Перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$.

ВНИМАНИЕ! После смешивания компонентов микропробирки сразу устанавливают в амплификатор и запускают реакцию.

Помещают микропробирки в амплификатор, задают программу амплификации со следующими параметрами:

- объем реакционной смеси – 30мкл;
- температурно-временные режимы:

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
95	05:00	1
94	00:10	30
50	00:20	
72	07:00	

После чего запускают программу амплификации и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора, расчетное время анализа составляет в среднем 1,5 часа.

8.2.2. Гибридизация

Для проведения гибридизации полученных в ПЦР амплифицированных фрагментов с ДНК-зондами на поверхности окрашенных микросфер реактивы для проведения гибридизации извлекают из холодильника (4 °C), перемешивают на вортексе в течение 1 минуты и озвучивают в ультразвуковой ванне в течение 30 секунд (при температуре 10 °C).

Для проведения реакции гибридизации используют планшет на 96 лунок «Bio-Rad» (не предоставляется). Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема: 0,5-10 мкл, 2-20 мкл и 20-200 мкл. В каждую лунку планшета в соответствии с количеством исследуемых и контрольных образцов вносят по 5 мкл микросфер из диагностической панели с иммобилизованными на поверхности вирусспецифическими ДНК-зондами (Реагент-3), 28 мкл 1,5×TМАС (не предоставляется), 5 мкл биотинилированной ДНК (продукт ПЦР), 12 мкл 1×TE буфера (не предоставляется).

Для предотвращения испарения реакционной смеси планшет заклеивают пленкой (не предоставляется) и помещают в амплификатор Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) и проводят реакцию гибридизации. В программу прибора вводят денатурацию ДНК при температуре 95 °C в течение 5 минут, гибридизацию ДНК-зондов на поверхности микросфер с амплифицированными

фрагментами ДНК при температуре 50 °С в течение 15 минут и хранение при 4 °С.

По окончании гибридизации, планшет центрифугировать при 2500 g 3 мин, затем вносят в каждую лунку планшета по 20 мкл раствора стрептавидин-R-фикоэритрина (не предоставляется). Перемешать пипетированием автоматическим дозатором используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Инкубировать при температуре гибридизации (50 °С) в течение 5 минут

8.3. Процедура измерения и оценки результатов анализа

Учет результатов проводят на мультиплексном проточном анализаторе Lumineх 200 с использованием компьютера с установленным программным обеспечением Bio-Plex Manager 6.0. и в соответствии с инструкцией к прибору Lumineх 200.

Цветовые регионы микросфер, используемые в наборе реагентов:

для гриппа типа А субтип Н1 (10);

для гриппа типа А субтип Н3 (20);

для гриппа типа А субтип Н5 (30);

для гриппа типа А субтип Н7 (40);

для гриппа типа А субтип Н9(50).

Результаты оценивают по наличию специфической флюоресценции репортерного красителя - стрептавидин-R-фикоэритрин – на микросфере, с иммобилизованным вирусспецифическим ДНК-зондом.

Результат подлежит учету в случае:

1. наличия положительного сигнала в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО-Н1/Н3/Н5, ПКО-Н7/Н9) в цветовых регионах, являющихся целевыми для аналитов, содержащихся в данных образцах;
2. отсутствия положительного сигнала в пробах с отрицательными контрольными образцами (ОКО).

3. отсутствие положительных флуоресцентных сигналов в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО-Н1/Н3/Н5, ПКО-Н7/Н9) в цветовых регионах, не являющихся целевыми для аналитов, содержащихся в данных стандартных образцах.

Результат считать положительным в случае, если интенсивность флуоресценции репортерного красителя превышает в 5 и более раз значение средней интенсивности флуоресценции в лунках отрицательных контролей.

Результат считать отрицательным, если значение интенсивности флуоресценции репортерного красителя не превышает значение средней интенсивности флуоресценции в лунках отрицательных контролей.

Анализ следует повторить, если значение интенсивности флуоресценции репортерного красителя в образцах превышает менее чем в 5 раз значение средней интенсивности флуоресценции в лунках отрицательных контролей.

9. РАСЧЕТЫ

9.1. Используемые компьютерные программы

Для проведения амплификации, гибридизации и учета результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителями приборов. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «Вектор-хМАР-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» хранить в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с ТУ 21.20.23-081-05664012-2017 при температуре от 2 до 8 °С.

10.2. Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Вектор-хМАР-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» должно производиться крытым транспортом

(автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с ТУ 21.20.23-081-05664012-2017 при температуре от 2 до 8 °С в термоконтейнере.

10.3. Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев со дня изготовления предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

10.4. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

Наборы с истекшим сроком годности, вскрытые, но не использованные наборы, а также наборы с поврежденной упаковкой, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

10.5. Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор-хМАР-Influenza H1/H3/H5/H7/H9» в течение срока годности направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, Россия, Новосибирская область, рабочий поселок Кольцово, тел. (383) 336-60-10, факс(383) 336-74-09 e-mail: vector@vector.nsc.ru).

ООО ЦИРМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ МИ «Набор реагентов для выявления кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 на олигонуклеотидных суспензионных биочипах «Вектор-хМАР-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» по ТУ 21.20.23-081-05664012-2017 на базе (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

При клинических испытаниях МИ «Вектор-хМАР-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» на 200 положительных пробах (2 по 100 проб), содержащих кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 в концентрации не менее 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси был получен положительный результат в 100 % случаев (200 проб из 200 заведомо положительных).

При клинических испытаниях МИ «Вектор-хМАР-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9» на 200 пробах, не содержащих кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 (80 проб, содержащих гетерологичные вирусы и по 20 проб неинфицированной культуральной суспензии клеток Vero, клеток MDCK, смывов из полости носоглотки, мокроты, мозговой суспензии мышей и содержащих ДНК человека), отрицательный ответ получен в 220 пробах (100 % случаев).

Таким образом, в ходе клинических испытаний с использованием 100 положительных проб, содержащих кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9 (каждая на 2 сериях набора), и на отрицательных пробах, содержащих ДНК человека (10 проб), неинфицированную культуральную суспензию клеток Vero (10 проб) и клеток MDCK (10 проб); смывы из полости носоглотки (10 проб), мокроту (10 проб), мозговую суспензию мышей (10 проб) и НК гетерологичных вирусов (аденовирус 5 типа (10 проб), вирус Повассан (10 проб), вирус денге (10 проб), вирус Коксаки А7 (10 проб)) – суммарно на 100 пробах (каждая на 2 сериях набора), доказана диагностическая эффективность МИ «Вектор-хМАР-Influenza Н1/Н3/Н5/Н7/Н9»:

- при исследовании 200 положительных проб (2 по 100 проб, содержащих кДНК вируса гриппа типа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7 и Н9) положительный результат получен в 200 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %;

- при исследовании 200 гетерологичных проб содержащих ДНК человека (10 проб), неинфицированную культуральную суспензию клеток Vero (10 проб) и клеток MDCK (10 проб); смывы из полости носоглотки (10 проб), мокроту (10 проб), мозговую суспензию мышей (10 проб) и НК гетерологичных вирусов (аденовирус 5 типа (10 проб), вирус Повассан (10 проб), вирус денге (10 проб),

вирус Коксаки А7 (10 проб)) отрицательный результат получен в 200 случаях.
Диагностическая специфичность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

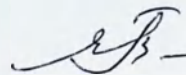
Зав. лабораторией молекулярной
эпидемиологии особо опасных
инфекций

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

Зав. ОБТК ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора»



В. А Терновой



М.П. Богрянцева



В данном доказательстве
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 23 листов
двадцать три листа
прописью
Др. наук М. П. Бабичев
должность, подпись