

УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора
по научно-производственной деятель-
ности Федерального государственного
бюджетного учреждения «Центр
стратегического планирования и
управления медико-биологическими
рисками здоровью» Федерального
медико-биологического агентства
Российской Федерации (ФГБУ «ЦСП»
ФМБА России)

Г.А. Шипулин

«22» ноября 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК вируса кори
(*Measles morbillivirus*) в биологическом материале
методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест® Корь»



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
КОМПЛЕКТАЦИЯ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	8
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	15
СОСТАВ	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	17
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	17
А. Подготовка проб для амплификации	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	19
В. Анализ и интерпретация результатов	20
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты – количество РНК-мишени (1 копия), содержащаяся в 1 геноме вируса
НК	- нуклеиновые кислоты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПИБ	- потенциально интерферирующие вещества
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 11 ПКО РНК	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК вируса кори
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»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК вируса кори (*Measles morbillivirus*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® Корь», далее – набор реагентов, предназначен для качественного выявления РНК вируса кори в пробах РНК, экстрагированной из биологического материала человека (мазков со слизистой носо- и ротоглотки), методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике кори для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на коревую инфек-

цию вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания. Специфическая патология – корь, вызванная вирусом *Measles morbillivirus*.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, выделенные из исследуемого материала с помощью комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Р.У. № РЗН 2020/12985).

Противопоказания 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 медицинского изделия

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»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление РНК вируса кори методом ПЦР проводится пациентам с клинической симптоматикой, характерной для инфекции, вызванной вирусом кори, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), с проведением реакции

обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО IC-R1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Экстракция РНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с Инструкцией по применению к набору реагентов для выделения НК в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО IC-R1). ВКО IC-R1 позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние 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 2 реакции ОТ-ПЦР – реакция обратной транскрипции РНК и амплификация участков кДНК вируса кори, а также реакция обратной транскрипции РНК и амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации кДНК вируса кори и кДНК ВКО IC-R1 регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 – Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуоро- фора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО IC-R1	кДНК вируса кори

Канал для флуоро- фора	FAM	JOE
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена нуклеопротеина (N)

КОМПЛЕКТАЦИЯ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50.

Предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяет определять РНК вируса кори в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования рекомендуется использовать комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Набор реагентов рассчитан на проведение 50 определений.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 — Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® Корь»

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

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 следующих образцов вирусов: *Mumps virus*, *Rubella virus*, *Human coxsackievirus*, *Human respiratory*

syncytial virus, Human respirovirus 1, Human rubulavirus 2, Human respirovirus 3, вируса гриппа В (Ямагатской разновидности), вируса гриппа А (H1N1), вируса гриппа А (H3N2) из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл.

При тестировании вышеперечисленных образцов положительных реакций (результатов) выявлено не было.

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена для набора реагентов в двух независимых лабораториях, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца СОП № 11 ПК О РНК МIs с концентрацией 1×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Результаты исследования представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Воспроизводимость исследования для набора реагентов «АмплиТест® Корь»

Тип образцов	Внутри постановки (повторяемость)		Между сериями		Между лабораториями		Итого	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные СОП №11 1×10^3 ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	12	100	18	100

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут находиться в пробе биологического материала или попасть в неё на этапе пробоподготовки биологического материала. Набор реагентов «АмплиТест® Корь» не используется на этапе пробоподготовки, предназначен только для следующего этапа – для анализа уже выделенной пробы РНК методом ОТ-ПЦР. Для пробоподготовки рекомендуются применять только зарегистрированные в РФ наборы реагентов для экстракции нуклеиновых кислот.

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и затем амплификация кДНК вируса кори и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО 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».

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты применения набора реагентов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты оценки диагностических показателей набора реагентов «АмплиТест® Корь»

Тип образцов	Характеристика образцов		Результаты применения набора реагентов	
Мазки из носо- и ротоглотки	Всего исследовано 75 образцов	положительных	25	0
		отрицательных	0	50

Были использованы:

– 25 образцов биологического материала (мазков из носо- и ротоглотки), содержащих вирус кори, полученных от пациентов с установленной коревой инфекцией;

– 75 образцов биологического материала (мазков из носоглотки), не содержащих вируса кори.

Диагностические характеристики набора реагентов представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® Корь»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)
Мазки из носоглотки	88,7-100 %	94,2-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся к III–IV групп патогенности, должны проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении 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 Зоне 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, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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»).

стр. 10 из 25

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции.
- Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, 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. Реагент для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков». (РУ № ФСР 2009/05515, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, или аналогичный).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания).
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Экси-джен, Инк.»), США).

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Р.У. № РЗН 2020/12985).
2. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
3. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axugen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного

объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).

10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - закручивающиеся 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 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм («ДНК Технологии», 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.

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 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 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 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 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.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК вируса кори с детекцией в режиме «реального времени» включает:

Реагент	Описание	Объем,	Количе-
Часть 1			
ПЦР-смесь-FL MIs	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	0,5	1 пробирки
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Taq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Часть 2			
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПКО РНК MIs	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 50 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 50 тестов), включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С; 2) температура хранения от плюс 2 до плюс 8 °С.

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».

Экстракцию РНК проводят в соответствии с Инструкцией по применению к комплекту реагентов «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

При экстракции РНК используют контрольные образцы этапов экстракции и ОТ-ПЦР.

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 MIs**.

Перед выделением внести в каждую пробирку (с исследуемыми и контрольными образцами) по **10 мкл** внутреннего контрольного образца **ВКО IC-R1**.

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.

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 MIs**, **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 MIs**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL MIs, 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 MIs**.
 - 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 роторного² и планшетного³ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	30 мин		1
2	95	15 мин		1
3	95	10 с	FAM, JOE	45
	58	20 с		
	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.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

стр. 19 из 25

² Rotor-Gene Q (QIAGEN)

³ CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия)

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 2 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 кДНК 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	
определено меньше граничного	отсутствует	НЕ обнаружена РНК вируса кори
определено или отсутствует	определено меньше граничного	Обнаружена РНК вируса кори
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат 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 амплификация с детекцией в режиме «реального времени»

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора JOE 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 JOE и/или FAM. 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. 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°C 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.

Часть 1 в составе реагентов ПЦР-смесь-FL Mls, ОТ-ПЦР-буфер-R, Taq полимераза, Ревертаза (MMIv), K- хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16°C. ПЦР-смесь-FL Mls хранить в защищенном от света месте.

Часть 2 в составе реагентов ОКО, ВКО IC-R1, ПКО РНК Mls хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °C.

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

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

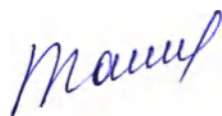
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик комплекта реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество комплекта реагентов направлять по адресу 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская улица, дом 10 стр.1, e-mail: promlab@cspfmmba.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению комплекта реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации комплекта 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

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью _____ лист _____

Зам. генерального директора по научно-
производственной деятельности ФГБУ «ЦСН»
ФМБА России

Г.А. Шипулин

