

Amplitech ГРИПП А (R)

Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (Influenza virus A) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech ГРИПП А (R))

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Только для ветеринарных и других немедицинских целей

Форма 1 **REF** P040-1  96

Форма 2 **REF** P040-2  96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
2 ФОРМЫ ВЫПУСКА	4
3 СОСТАВ	4
4 ПРИНЦИП МЕТОДА	5
4.1 Характеристика положительного контроля ПК VET	5
5 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
7 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	7
8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
8.1 Автоматизированная экстракция РНК и подготовка к проведению ОТ-ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ОТ-ПЦР и детекции	10
8.2 Экстракция РНК и ручная подготовка к проведению ОТ-ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ОТ-ПЦР и детекции	12
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	13
10 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	14
11 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	15
11.1 Контроли, используемые в процессе исследования	15
11.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации	15
11.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований	15
12 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	16
12.1 Предел обнаружения	16
12.2 Аналитическая специфичность	16
12.3 Прецизионность измерения	16
13 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	16
13.1 Срок годности	16
13.2 Хранение	17
13.3 Транспортирование	17
13.4 Эксплуатация	17
14 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	17
15 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18
16 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	18
17 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая инструкция по применению версии 10.03.25 распространяется на изделие «Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (Influenza virus A) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech ГРИПП А (R))» (далее – набор). Данный набор реагентов не является медицинским изделием и не предназначен для использования в лабораторной диагностике *in vitro* заболеваний человека.

Краткое наименование набора: Amplitech ГРИПП А (R).

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления РНК вируса гриппа А (Influenza virus A) методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы РНК, экстрагированной из следующего материала:

- мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки, трахеи;
- помет птиц, мазки из клоаки;
- тканевой (аутопсийный) материал животных (трахеи, легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, почек, сердца, яйцо, аллантоисная и амниотическая жидкость эмбрионов кур и др.);
- продукты питания и корма животного происхождения (мясо птиц, свиней, лошадей, мясные полуфабрикаты и субпродукты, комбикорма), мазки с поверхности мяса и субпродуктов.

2 ФОРМЫ ВЫПУСКА

Набор выпускается в двух формах¹ (см. таблицу 1).

Таблица 1

Описание форм выпуска набора

Форма	Описание	Количество исследований, в том числе для контролей
1	Готовая к применению реакционная ОТ-ПЦР-смесь в виде геля, раскапанная в 96-луночный планшет	96
2	Готовая к применению реакционная ОТ-ПЦР-смесь для разнесения по пробиркам	96

3 СОСТАВ

Состав набора указан в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Состав формы 1

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Планшет со Смесью ГРИПП А (R) (Реакционная ОТ-ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, ревертазой, дНТФ, солями)	—	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентом в виде геля (от светло-голубого до синего цвета) на дне пробирок
Плёнки для планшета	—	2 шт.	Клейкие плёнки
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом РНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК VET (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом кДНК Influenza virus A)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	—	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/

¹ Набор в форме выпуска 1 упакован в коробку из картона, в форме выпуска 2 - в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

² В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта и инструкции.

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Таблица 3

Состав формы 2

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь ГРИПП А (RW) (Реакционная ОТ-ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, ревертазой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-серого до фиолетового цвета
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом РНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК VET (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом «ДНК Influenza virus A»)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

4 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов ОТ-ПЦР и раздельное выявление мишеней обеспечивается применением в реакционной смеси для ОТ-ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 4).

Таблица 4

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
FAM/Green	РНК Influenza virus A	M1 gene
Cy5/Red	РНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

4.1 Характеристика положительного контроля ПК VET

Концентрация клонированного фрагмента РНК Influenza virus A в ПК VET составляет $5 \text{ Ig} \pm 0,5 \text{ Ig}$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [1, 2].

5 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 5.

Таблица 5

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Необходимое оборудование и материалы в случае	
автоматизированной подготовки к проведению ОТ-ПЦР для формы выпуска 1	ручной подготовки к проведению ОТ-ПЦР для форм выпуска 1 и 2
• автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО РНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446), QuantGene 9600 (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd.)); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.	• ОТ-ПЦР-бокс; • центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518); • дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 5 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО РНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH; РУ № ФСЗ 2010/07595), QuantGene 9600 (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd.)); • штатив для ПЦР-планшетов (при использовании формы 1) (РУ № ФСЗ 2011/10287); • штатив для пробирок объёмом 0,2 мл (при использовании формы 2); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз (при использовании формы 2 и амплификаторов планшетного типа); • пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с плоской крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз, (при использовании формы 2 и амплификаторов роторного типа); • наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 15190 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.
- Утилизировать реагенты и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.
- Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.
- Утилизировать биологический материал, а также расходные материалы и инструменты, загрязнённые биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса Б.
- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 2 и 3 для соответствующей формы выпуска набора.
- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.
- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

Реагенты, входящие в состав набора, содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

7 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования материала, указанного в разделе 1.

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие мазков со слизистой оболочки ротоглотки, носоглотки и трахеи
Взятие мазка провести с помощью сухого медицинского стерильного одноразового зонда в пробирку с транспортной средой или физиологическим раствором.
Взятие и предобработка помета птиц
Использовать пробы помета, массой(объемом) примерно 1–3 г (1–3 мл). Перенести пробу в количестве 1 г (1 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовым шпателем в стерильный контейнер.
Предобработка: В пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовой лопаткой) внести 0,1 г (0,1 мл) помета и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования однородной суспензии.
При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к приготовленной суспензии фекалий добавить глицерин в конечной концентрации 10–15 %. После тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 мин пробы заморозить.
Взятие ректальных мазков, мазков из клоаки
Взятие материала провести путем введения зонда в задний проход (клоаку) на глубину 4 – 5 см, аккуратно вращая зонд вокруг оси, собрать материал на зонд, осторожно извлечь зонд. Перенести зонд в пробирку с транспортной средой.
Взятие и предобработка фрагментов тканей и органов
Фрагменты органов (трахеи, миндалины, селезенка, легкие, печень, сердце и др.) отбирают в стерильные контейнеры.
Предобработка: Пробы тканей и органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию, используя стерильный физиологический раствор или фосфатный буфер. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2000 g в течение 5-10 минут. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК. В некоторых случаях образовавшуюся суспензию не центрифугируют, а оставляют при комнатной температуре в течение 15-30 минут, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят в пробирку объемом 1,5 мл.
Взятие и предобработка продуктов и изделий животного происхождения
Продукты животного происхождения (мясо птиц, свиней, лошадей, мясные полуфабрикаты и субпродукты, комбикорма) отбирают в стерильные контейнеры.
Предобработка: Навеску исследуемых образцов массой не менее 100 мг растирают пестиком в ступке до однородного состояния, используя фосфатный буфер или физиологический раствор. Гомогенизацию образцов плотных продуктов рекомендуется проводить с использованием автоматических гомогенизаторов и сопутствующих расходных материалов.
В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать 1,2 мл полученной суспензии. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 3 000 g в течение 5 мин.
При исследовании желатина готовят 10 % суспензию. Для этого навеску желатина заливают горячим стерильным физиологическим раствором (60-70°C), тщательно перемешивают и оставляют в термостате (60-65°C) до полного растворения периодически перемешивая (около 5 минут). При растворении желатина объем жидкости уменьшается – в процессе растворения доливают горячий физиологический раствор до изначального объема, перемешивают и продолжают прогрев. После полного растворения полученную суспензию используют в экстракции.
Отбор яиц, куриных эмбрионов
Отбор проб проводят в чистую стеклянную или пластиковую посуду или одноразовые пластиковые пакеты.
Пробоподготовка проб яиц: Яйца в скорлупе разбивают и осторожно, не повреждая желток, отделяют основную массу яичного белка. Отбирают 1,0 мл пробы белка в физиологический раствор 500 мкл, тщательно перемешивают или гомогенизируют до однородной массы, не допуская вспенивания. Маркируют и хранят до и после проведения анализа.
Взятие аллантаической жидкости

Для получения аллантаической жидкости в скорлупе куриных эмбрионов прокалывают отверстие и отбирают стерильным шприцем в пробирку объемом 1,5 мл 1,0–1,5 мл аллантаической жидкости.

Взятие и предобработка амниотической жидкости

Амниотическую жидкость отбирают при помощи стерильного шприца. Исследуемую пробу в количестве 1 мл отдельным наконечником переносят в стерильную пробирку.

Предобработка:

Исследуемый материал тщательно ресуспендируют на вортексе. Отбирают, используя наконечник с фильтром 1 мл материала и переносят в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугируют 10 минут при 10 тыс. g.

После проведения центрифугирования надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 100 мкл жидкости, затем ресуспендируют материал на вортексе.

Взятие смывов с объектов окружающей среды

При взятии смывов с поверхности (внутрилабораторные, тары, кормушки, места содержания животных, оборудования, приборов, инвентаря, расходных материалов), пользуются стерильными ватными зондами. Записывается номер образца по порядку, место взятия смыва, техническое и санитарное состояние оборудования (приборы, поверхность и т. д.), с которого взят смыв, время забора.

Предобработка подстилок:

Из средних проб подстилки готовят 10% суспензию с использованием физиологического раствора и отстаивают в течение 10 минут для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый фильтр. Фильтрат собирают во флаконы объемом 50 мл и подвергают однократному замораживанию – оттаиванию. После оттаивания пробы освещают при низкоскоростном центрифугировании при 2000 g в течение 20 мин. Супернатант фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм. После окончания фильтрации мембранные фильтры разрезают ножницами на мелкие кусочки, переносят стерильным анатомическим пинцетом в стерильный флакон, содержащий 10 мл физиологического раствора. Для обратной сорбции вирусов с фильтра флакон встряхивают в течение 10 мин с помощью шейкера. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. В чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл отобрать 1 мл полученной суспензии. Центрифугировать пробирки с исследуемыми образцами при 1200 g в течение 10 мин.

Таблица 7

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Взятие мазков со слизистой оболочки ротоглотки, носоглотки и трахеи

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Слюну отбирают не менее 1 мл в одноразовую стерильную пробирку объемом 2,0 мл, либо в контейнер с завинчивающейся крышкой без транспортной среды.

Допускается хранение образцов мазков и слюны до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Помет птиц

Условия хранения и перевозки образцов:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Ректальные мазки, мазки из клоаки

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Продукты питания и изделия животного происхождения

Допускается хранение образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
 - при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
 - при температуре минус 68 °С – длительно.
- Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Яйца, куриные эмбрионы

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Аллантоисная жидкость

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Амниотическая жидкость

Образцы исследуемого материала хранят при следующих условиях:

- при температуре 2 – 8 °С – в течение 3 суток (цельную кровь допускается хранить при данной температуре в течение 7 суток);
- при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание исследуемых образцов.

Фрагменты тканей и органов

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1 Автоматизированная экстракция РНК и подготовка к проведению ОТ-ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ОТ-ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

Экстракцию РНК из исследуемого материала и контролей, а также внесение образцов экстрагированной РНК в пробирки планшета с реакционной Смесью ГРИПП А (R) провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции РНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-BET (R)» (ООО «Амплитек»).

8.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК VET, и осадить капли на вортексе.

8.1.2 Подготовить картридж с реагентами из набора «НК-BET (R)» и внести в него исследуемые образцы и контроли в следующем объеме:

ВК – 10 мкл, ОК – 100 мкл; ПК VET – 100 мкл; исследуемые образцы – 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК VET не менее чем в одном повторе.

Примечание – На усмотрение специалиста при проведении массовых мониторинговых / скрининговых исследований допускается пулирование образцов (объединение до 5 проб), при

этом следует учитывать особенности вида биоматериала во избежание возможного снижения чувствительности. В таком случае объем образца будет рассчитываться по формуле: 100 мкл / количество образцов.

- 8.1.3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «НК-ВЕТ (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.
- 8.1.4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью ГРИПП А (R) и снять с них защитную плёнку.
- 8.1.5 Установить отрезанные пробирки со Смесью ГРИПП А (R) на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.
- 8.1.6 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:
 - а) протокола экстракции РНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-ВЕТ (R)»;

Примечание – В протоколе указать объем элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ОТ-ПЦР объем элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ОТ-ПЦР.

- б) протокола подготовки к проведению ОТ-ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «Amplitech ГРИПП А (R)».

ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

- 8.1.7 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech ГРИПП А (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции РНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесённым элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

- 8.1.8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 8.

Таблица 8

Программа ОТ-ПЦР и детекции при подготовке к проведению ОТ-ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1»

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM/Green, Cy5/Red	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
 - 2) При использовании ПО «Amplitech ULA» процесс программирования амплификатора осуществляется в автоматическом режиме.
- 8.1.9 Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

8.2 Экстракция РНК и ручная подготовка к проведению ОТ-ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ОТ-ПЦР и детекции

- 8.2.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК VET, и осадить капли на вортексе.
- 8.2.2 Провести экстракцию РНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «НК-ВЕТ (R)» (ООО «Амплитек») формы 1 или формы 2 (с применением автоматической или ручной методики соответственно) согласно инструкции по его применению.

Примечания

- 1) Элюцию провести в объёме 100 мкл.
- 2) На усмотрение специалиста при проведении массовых мониторинговых / скрининговых исследований допускается пулирование образцов (объединение до 5 проб), при этом следует учитывать особенности вида биоматериала во избежание возможного снижения чувствительности. В таком случае объём образца будет рассчитываться по формуле: 100 мкл / количество образцов.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК VET не менее чем в одном повторе.

- 8.2.3 В зависимости от используемой формы выпуска набора «Amplitech ГРИПП А (R)» провести подготовку к проведению ОТ-ПЦР в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР в зависимости от формы выпуска набора «Amplitech ГРИПП А (R)»

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
- Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью ГРИПП А (R) - Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку. - Для удобства внесения образцов РНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов. - Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК VET). ВНИМАНИЕ! При внесении РНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов РНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech ГРИПП А (R)».	- Перемешать содержимое пробирки со Смесью ГРИПП А (RW) и осадить капли на вортексе. - Внести в ПЦР-пробирки по 10 мкл Смеси ГРИПП А (RW). - Внести в подготовленные пробирки с реакционной Смесью по 15 мкл образцов РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК VET). ВНИМАНИЕ! При внесении РНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов РНК

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
	закрыть пробирки крышкой.

ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения РНК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

8.2.4 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 10.

Таблица 10

Программа ОТ-ПЦР и детекции при ручной подготовке к проведению ОТ-ПЦР

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM/Green, Cy5/Red	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
 - 2) При программировании прибора Rotor-Gene Q установить галочки «15мкл с добав. воска» и «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции» по позиции первой пробирки.
 - 3) При использовании ПО «Amplitech ULA» процесс программирования амплификатора осуществляется в автоматическом режиме.
- 8.2.5 Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 9.1 При использовании программного обеспечения «Amplitech ULA» результаты учитываются и интерпретируются автоматически, после чего формируется бланк с полученными данными.
- 9.2 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Для планшетных амплификаторов рекомендуется выставлять пороговую линию на уровне 5-10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.
При работе с прибором Rotor-Gene Q установить по каналу Green значение «Threshold/Порог» равным 0.1 и 0,05 по каналу Red. Для обоих каналов установить устранение выбросов (NTC) 10%, включить корректировку уклона и динамический фон.
- 9.3 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 11.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

	Результат	Интерпретация
1	По каналу Cy5/Red значение Ct определено не больше 36. По каналу FAM/Green значения Ct отсутствуют.	РНК Influenza virus A в образце <i>не выявлена</i> .
2	По каналу Cy5/Red значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM/Green определено значение Ct.	В образце <i>выявлена</i> РНК Influenza virus A
3	По каналу Cy5/Red значение Ct отсутствует или определено больше 36. По каналу FAM/Green значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 12.

Таблица 12

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналу FAM/Green значение Ct отсутствует. По каналу Cy5/Red значение Ct определено не больше 36.
ПК VET	По каналу FAM/Green определено не больше 35. По каналу Cy5/Red значение Ct определено не больше 36.

10 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 13.

Таблица 13

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу FAM/Green и/или Cy5/Red отсутствует или определено больше 35 и/или 36 соответственно.	Некорректное проведение экстракции РНК и/или ОТ-ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
Для ОК по каналу Cy5/Red значение Ct отсутствует или определено больше 36.	Некорректное проведение экстракции РНК и/или ОТ-ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
Для ОК по каналу FAM/Green определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
Невалидный результат для исследуемого образца (значение Ct по каналу Cy5/Red отсутствует или определено больше 36, по каналу FAM/Green значения Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции РНК. Наличие в образце ингибиторов ОТ-ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для исследуемого образца/контролей определено значение C_t , при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ОТ-ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей.

11 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

11.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 12.

11.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК VET для контроля корректного прохождения исследования.

11.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции РНК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации используется экзогенный ВК, который добавляется на этапе экстракции РНК в каждый исследуемый образец и контроли. Отсутствие результатов амплификации для ВК и одновременно для выявляемого вируса свидетельствует о присутствии ингибиторов ОТ-ПЦР в образце и/или некорректном проведении экстракции РНК.

11.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

11.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению РНК выявляемого вируса, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для выявления РНК выявляемого вируса в биологическом материале методом ОТ-ПЦР.

12 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА³

12.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 14.

Таблица 14

Предел обнаружения		
Мишень	Предел обнаружения, копий/мл	95 %-ый ДИ, копий/мл
PHK Influenza virus A	800	391-1351

12.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 15 и геномной ДНК птицы. НК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК птицы - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 15

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
African swine fever virus	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Influenza virus B (В/Москва/46/2019)	
<i>Clostridium difficile</i>	Rotavirus A	

12.3 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_n пороговых циклов (Ct), характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v пороговых циклов (Ct), характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

13 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

13.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ВК, ПК VET, ОК, Смесь ГРИПП А (RW) использовать до истечения срока годности набора. Пробирки со Смесью ГРИПП А (R) после снятия защитной пленки хранить не более 30 минут.

Не допускается смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

³ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями НК выявляемых микроорганизмов.

13.2 Хранение

Форму выпуска 1 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от солнечного света месте. Планшет со Смесью ГРИПП А (R) беречь от влаги. Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

Форму выпуска 2 в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от солнечного света месте.

Реагенты после вскрытия рекомендуется хранить при температуре от 2 °С до 8 °С. Допустимо размораживать и замораживать реагенты не более 4 раз.

13.3 Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

13.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

14 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

Сt	– cycle threshold (пороговый цикл)
в.	– версия
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ДНКазa	– дезоксирибонуклеаза
РНКазa	– рибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ОТ	– обратная транскрипция
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

15 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

Сообщения о неблагоприятных событиях (инцидентах), возникших при работе с набором и не указанных в данной инструкции, следует направлять производителю по указанному выше адресу и в уполномоченный регуляторный орган согласно действующему законодательству.

16 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

17 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Код серии



Дата изготовления



Использовать до



Не допускать воздействия
влаги



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению



Не допускать воздействия
солнечного света



Содержимого достаточно для
проведения <n> тестов



Номер по каталогу



Общество с ограниченной ответственностью «Амплитек»
(ООО «Амплитек»),
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru,
e-mail: support@amplitech.ru