

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И. Покровский

_____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*)

в объектах окружающей среды и клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Enterovirus-FL*»

78
« УТВЕРЖДАЮ »

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

« _____ » _____ 20 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*)

в объектах окружающей среды и клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

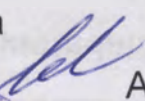
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Enterovirus-FL*»

«СОГЛАСОВАНО»

И.О.директора ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора


А.А.Мовсисянц

« 9 » 2009 г.



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	7
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК/РНК.....	8
ВАРИАНТ FER	9
СОСТАВ	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	9
ЭКСТРАЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	10
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	10
Б. Проведение амплификации	11
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	12
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	12
ВАРИАНТ FRT	14
СОСТАВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	14
ЭКСТРАЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	15
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка пробирок для амплификации	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
кДНК	- комплементарная ДНК
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ПКО	- положительный контрольный образец
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus*-FL» предназначен для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*) путем получения кДНК и амплификации специфического фрагмента кДНК данного микроорганизма методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, полученные путем экстракции РНК из стерильных и нестерильных типов клинического материала (спинномозговая жидкость, отделяемое везикул, мазки из ротоглотки, образцы фекалий) в соответствии с показаниями представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции»

Для экстракции (выделения) РНК и проведения реакции обратной транскрипции используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК энтеровирусов (*Enterovirus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя четыре этапа: экстракцию (выделение) РНК из образцов клинического материала, получение кДНК в ходе реакции обратной транскрипции, ПЦР-амплификацию участка кДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция РНК из

P/

клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции, в ходе которой получают кДНК. Пробы кДНК используются для амплификации участка кДНК *Enterovirus* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 вариантах.

Вариант FEP

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации кДНК *Enterovirus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК («РИБО-сорб», «РИБО-преп») и проведения реакции обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L»), или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50.

Форма комплектации 1 и 2 предназначена для проведения амплификации кДНК *Enterovirus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК («РИБО-сорб», «РИБО-преп») и

82
проведения реакции обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L»), или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
СМЖ	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5x10 ³ ГЭ/мл.
СМЖ	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5x10 ³ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов: штаммы энтеровирусов (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio (Sabin) I, II, III); вирусов гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусов, RS вирусов, аденовирусов человека – 3, 5, 7, 37, 40 типов; штаммы N meningitidis, St pneumoniae, H influenzae, Klebsiella K 65 SW4, Listeria monocitogenes УСХЧ 19, Listeria monocitogenes УСХЧ 52, Proteus vulgaris 115/98, Pseudomonas aeruginosa ДН с1, Staphilococcus aureus 653, Staphilococcus aureus 29112, Morganella Morganii 619 с 01, Enterobacter faecalis 356.

При проведении тестирования данных панелей, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности

5
ИФБ

83

(опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения РНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.
3. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТАЛ» (ТУ 9398-005-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
4. Дополнительные материалы и оборудование для проведения реакции обратной транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для ОТ.
5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
6. Центрифуга/вортекс.
7. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл и от 50 до 1000 мкл).
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.

- 84
9. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
 10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
 11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
 12. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

13. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «MAXYGENE» («Ахуген», США), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») или аналогичные).
14. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT и вариант FRT 50:

15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» – при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT (например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), «iQ5» («Bio-Rad», США), «Mx3000P» («Stratagene»).
16. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл – при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT 50:
 - а) пробирки для ПЦР с плоской крышкой, нестрипованные (например, «Ахуген», США) – при использовании прибора роторного типа с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).
 - б) пробирки для ПЦР с куполообразной крышкой (например, «Ахуген», США) - при использовании прибора планшетного типа с детекцией через крышку (например, «iQ5»).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат стерильные и нестерильные типы клинического материала (спинномозговая жидкость, отделяемое везикул, мазки из ротоглотки, образцы фекалий) в соответствии с показаниями представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции».

ВАРИАНТ FEP

ВАРИАНТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагмента кДНК энтеровирусов (*Enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

Реактив	Описание	Объем,	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции (выделения) РНК:

Реактив	Описание	Объем,	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ОТ-ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЯХ по применению набора реагентов для выявления РНК

мфд

энтеровирусов (*Enterovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» (вариант FEP).

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию (выделение) РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-rec).

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus* для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus* на поверхность застывшего воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus*.
3. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить образец «Фон». Для этого в пробирку с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus* на поверхность застывшего воска внести 17 мкл ПЦР-смеси-Фон. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в ходе проведения реакции обратной транскрипции из исследуемых или контрольных образцов.
6. Поставить контрольные реакции:
- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-) –** внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+ EV) –** внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК Enterovirus**.
 - в) **положительный контроль ПЦР (К+ ВКО) –** внести в пробирку **10 мкл ПКО STI**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции РНК (В-) -** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

- 1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 1).
- 2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа амплификации кДНК Enterovirus

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):					
	«Терцик» («ДНК-технология»)			«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Maxygene» («Axygen»)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42
	54 °С	10 с		54 °С	25 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение	

- 3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *Enterovirus*.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» (вариант FEP).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб кДНК, полученных путем экстракции из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *Enterovirus* **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения положительного результата.
- кДНК *Enterovirus* **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, и сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения отрицательного результата, но

ВАРИАНТ 1ЕР

ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями).

Если для пробы получен **невалидный** или **сомнительный** результат, требуется повторить ОТ-ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК, в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу	
		FAM	HEX
B-	Экстракция (выделение) РНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
K-	ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
K+EV	ПЦР	Ниже порогового значения	Выше порогового значения положительного результата
K+BKO	ПЦР	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналу HEX ниже порогового значения положительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена кДНК *Enterovirus*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (B-) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу HEX выше порогового значения положительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК *Enterovirus*, начиная с этапа выделения (экстракции) РНК.

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов (*Enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции (выделения) РНК:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87-гес	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50 – комплект реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов (*Enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	1,7	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая

контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции (выделения) РНК:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ОТ-ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» (вариант FRT).

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию (выделение) РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-rec).

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Для формы комплектации 2:

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus*** (объем 0,12 мл). Перемешать содержимое пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus*** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Пробирку с **воском для ПЦР** прогреть в термостате при температуре 95 °С до полного расплавления воска.
4. Раскапать на дно микропробирок для амплификации по **5 мкл** соответствующей **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Enterovirus***.
5. Сверху добавить по капле (примерно 10 - 15 мкл) расплавленного воска так, чтобы он полностью накрыл жидкость, закрыть крышки пробирок, подписать на каждой сокращенное название инфекции. Пробирки с разлитой **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT** и воском можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 нед.

Для всех форм комплектации:

6. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
7. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Enterovirus***.
8. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в ходе проведения реакции обратной транскрипции из исследуемых или контрольных образцов.
9. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+ EV)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО**

кДНК *Enterovirus*.

- в) положительный контроль ПЦР (К+ ВКО) – внести в пробирку 10 мкл ПКО STI.
- г) отрицательный контроль экстракции РНК (В-) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из ОКО.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

- 1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа для амплификации кДНК *Enterovirus*

Приборы роторного типа ¹				Приборы планшетного типа ²		
Цикл	Температура, °C	Время	Число повторов циклов	Температура, °C	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	45	95	10 с	45
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	20 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/HEX/Yellow (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

- 2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- 3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

¹ например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные
² например, «iCycler», «iQ5», «Mx3000P», «Mx3000», «ДТ-96» или аналогичные

- по каналу для флуорофора FAM/Green регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК *Enterovirus*.

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 «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *Enterovirus* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow определено значение порогового цикла Ct. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК *Enterovirus* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM/Green определено значение порогового цикла Ct, не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow, и по каналу для флуорофора FAM/Green значение Ct также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту и методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» (вариант FRT).

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции (выделения) РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу для флуорофора FAM/Green	по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow
B-	Экстракция (выделение) РНК	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
K-	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
K+EV	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Определено значение меньше граничного
K+BKO	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует или больше граничного

ВНИМАНИЕ!

- 1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора FAM/Green отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена кДНК *Enterovirus*.
- 2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (B-) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу JOE/HEX/Yellow выше порогового значения положительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК *Enterovirus*, начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

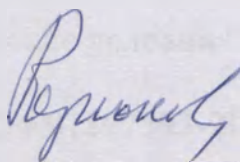
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме ПЦР-смеси-1-FEP/FRT Enterovirus объемом 0,12 мл). ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Enterovirus объемом 0,12 мл хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Enterovirus хранить в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® Enterovirus-FL» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний



Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора