



Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов

АмплиСенс® *Enterovirus /*
Parechovirus-FL

Форма 1: **REF** H-3751-1-2

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru



IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

– «РИБО-преп».

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК

Элюция

все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
-------------	--------	-------------------

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

Комплекты для обратной транскрипции:

- «РЕВЕРТА-L».

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более недели и при температуре не выше минус 68 °С – до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2

Общий объем реакционной смеси: 30 мкл, включая объем пробы кДНК (10 мкл).

Контроли: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* / *Parechovirus* для амплификации кДНК исследуемых и контрольных образцов. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.

Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфера-К	в каждую пробирку, на поверхность воска, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL <i>Enterovirus</i> / <i>Parechovirus</i>
Проб кДНК, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы кДНК, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из ОК	в пробирку для ОК
К+ <i>Enterovirus</i> / <i>Parechovirus</i>	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК (кДНК) возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. 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 по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трём каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i>	кДНК <i>Parechovirus</i>

ВНИМАНИЕ! Граничные значения порогового цикла (Ct), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов, указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов или расположенном на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
ВЕРНО

прошито, пронумеровано и скреплено печатью 2
10/01/2021 листов (а)

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Доверенность №
178/21 от 16.11.2021 г.)

«14» января 2021 г. А.О.Лисицына А.О.Лисицына



«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

« 15 » декабря 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® Enterovirus / Parechovirus-FL

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	12
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	21
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	23
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	24
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	24
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ.....	25
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2).....	26
СОСТАВ	26
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	26
А. Подготовка проб для амплификации	26
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	27
В. Анализ и интерпретация результатов.....	28
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	31
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FL	- ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
EV	- <i>Enterovirus</i> (энтеровирус)
PEV	- <i>Parechovirus</i> (парэховирус)
PBS	- фосфатно-солевой буфер

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® *Enterovirus* / *Parechovirus*-FL предназначен для качественного определения РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) видов/кластеров А, В, С, D, без дифференцировки между ними, и РНК парэховирусов человека (*Human parechovirus*) видов/кластеров А, В, без дифференцировки между ними, в биологическом материале (фекалии, спинномозговая жидкость, мазки из респираторного тракта, мокрота, тканевой (биопсийный, аутопсийный) материал от человека) и объектах окружающей среды (концентраты образцов воды) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы кДНК, полученные в результате реакции обратной транскрипции РНК, экстрагированной из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на энтеровирусную и/или пареховирусную инфекцию вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для исследования объектов окружающей среды и аутопсийного материала с целью установления посмертного диагноза.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL), проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых вирусов и кДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента ревертазы (MMIv). Амплификация участков кДНК проводится при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемой кДНК-мишени, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе ПЦР одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i>	кДНК <i>Parechovirus</i>
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	5'UTR	5'UTR

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2

Форма 1 предназначена для проведения амплификации кДНК энтеровирусов человека (*Enterovirus*) и пареховирусов (*Parechovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции РНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для обратной транскрипции	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) ¹ , ГЭ/мл
Мокрота	«РИБО-преп»	«РЕВЕРТА-L»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2	3×10^4
Фекалии				1×10^4
Тканевой материал				1×10^4
Концентраты образцов воды				5×10^3
Спинномозговая жидкость (СМЖ)				5×10^3
Мазки из респираторного тракта				5×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки кДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих панелей проб нуклеиновых кислот:

1. РНК энтеровирусов человека (представителей разных генетических кластеров: кластер А - *Human coxsackievirus* A4, A5, A6, A9, A16; кластер В - *Human echovirus* 2, 6, 9, 11, 14, 16, 17, 18, 30, *Human coxsackievirus* B4, B5 (клинические образцы, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей); кластер С - *Human poliovirus* 1, 2, 3 (вакцинные штаммы); кластер D - *Enterovirus* D68 (ATCC® VR-1825PQ™)); *Parechovirus* А и В (клинические образцы, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл. При тестировании образцов РНК вышеперечисленных штаммов/клинических

¹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

образцов были получены положительные результаты.

2. РНК вирусов гриппа А (H3N2 (NCBI:txid2029290), H1N1 (NCBI:txid1898984)) и В, риновирусов, RS вирусов, ДНК аденовирусов человека – 3 типа (GenBank: FJ167580.1), 5 типа (GenBank: FJ167596.1), 7 типа (GenBank: KU361344.1), 37 типа (GenBank: AY048776.1), 40 типа (GenBank: FJ167570.1), 41 типа (GenBank: FJ167574.1) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл (клинические образцы, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).
3. Пробы нуклеиновых кислот, экстрагированные из штаммов из коллекции ATCC® с концентрацией не менее 1×10^6 микробных клеток/мл (American Type Culture Collection, США): *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617™, *Bordetella pertussis* ATCC® 9340™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida guilliermondii* ATCC® 6260™, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Clostridium difficile* ATCC® 9689™, *Clostridium septicum* ATCC® 12464™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium minutissimum* ATCC® 23348™, CL1904 3, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*) ATCC® 43055™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Enterococcus faecalis* (vancomycin resistant) ATCC® 51299™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC® 19414™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Escherichia coli* ATCC® 35218™, *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 9006™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211™, *Haemophilus parainfluenzae* ATCC® 7901™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* (*murrayi*) ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 25238™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 8176™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria*

lactamica ATCC® 23970™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™ (Serogroup C), *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™ (Serogroup B), *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Propionibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC® 14028™, *Serratia marcescens* ATCC® 14756™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6303™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 43300™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 33591™, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 12600™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC® 29970™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 49907™, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813™, *Streptococcus equisimilis* ATCC® 12388™, *Streptococcus equi* subsp. *equi* ATCC® 9528™, *Streptococcus bovis* (Group D) ATCC® 9809™, *Streptococcus mutans* ATCC® 35668™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6305™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus salivarius* ATCC® 13419™, *Streptococcus uberis* ATCC® 700407™, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802™.

При тестировании панелей №2 и №3, а также образцов ДНК человека (0,2 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США), неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие РНК *Enterovirus*, РНК *Parvovirus* концентрации 5×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® *Enterovirus* / *Parechovirus*-FL в сравнении с референтным методом

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® <i>Enterovirus/Parechovirus</i> -FL		Результаты применения референтного метода ²	
				положительных	отрицательных
<i>Enterovirus</i>	Фекалии	Всего исследован 281 образец	положительных	103	5
			отрицательных	0	173
	Концентраты образцов воды	Всего исследовано 137 образцов	положительных	36	0
			отрицательных	0	101
	Спинномозговая жидкость	Всего исследован 341 образец	положительных	182	4
			отрицательных	0	155
	Мазки из респираторного тракта	Всего исследовано 202 образца	положительных	38	0
			отрицательных	1	163
	Образцы мокроты	Всего исследовано	положительных	65	0
			отрицательных	0	82

² В качестве референтного метода для детекции *Enterovirus* использовался набор реагентов «АмплиСенс *Human enterovirus*-FL» (ПУ № РЗН 2021/13712).

Референтной методики для определения *Parechovirus*, зарегистрированной на территории РФ, не существует. Все положительные находки были подтверждены методом прямого секвенирования продуктов амплификации.

Выявляе- мый патоген	Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® <i>Enterovirus/Parechovirus- FL</i>		Результаты применения референтного метода ²	
				положитель- ных	отрицатель- ных
<i>Parechovirus</i>	Тканевой материал	147 образцов			
		Всего исследовано 136 образцов	положительных	39	0
			отрицательных	0	97
	Фекалии	Всего исследован 281 образец	положительных	59	0
			отрицательных	0	222
	Концентраты образцов воды	Всего исследовано 137 образцов	положительных	31	0 *
			отрицательных	0	106
	Спинномозговая жидкость	Всего исследован 341 образец	положительных	45	0
			отрицательных	0	296
	Мазки из респираторного тракта	Всего исследовано 202 образца	положительных	40	0
			отрицательных	0	162
	Образцы мокроты	Всего исследовано 147 образцов	положительных	62	0
			отрицательных	0	85
	Тканевой материал	Всего исследовано 136 образцов	положительных	39	0
			отрицательных	0	97

Для оценки диагностических характеристик были использованы:

- 281 образец фекалий от пациентов с серозными менингитами и клинически здоровых лиц (амбулаторно вакцинируемые дети) в период 2013-2021 гг.
- 341 образец спинномозговой жидкости от пациентов с серозными менингитами и пациентов с гнойными бактериальными менингитами в период 2007-2011 гг.
- 202 образца мазков из респираторного тракта от пациентов с серозными менингитами и от пациентов с ОРВИ различной этиологии 2014-2021 гг.
- 85 образцов мокроты от пациентов с серозными менингитами и от пациентов с ОРВИ различной этиологии, а также 62 модельных образца, контаминированных разведениями стандартных образцов предприятия СОП № 47 ПКО *Enterovirus-rec* и СОП № 243 ПКО *Parechovirus-rec* в

концентрации 3×10^4 ГЭ/мл.

- 113 образцов аутопсийного материала, полученных от пациентов с летальным исходом в период 2014-2020 гг., а также 23 модельных образца, контаминированных разведениями стандартных образцов предприятия СОП № 47 ПКО *Enterovirus*-рес и СОП № 243 ПКО *Parechovirus*-рес в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл.
- 137 концентратов образцов воды (106 образцов, полученных из субъектов РФ в рамках деятельности Российского Референс-центра по мониторингу возбудителей кишечных инфекций 2015-2020 гг., и 31 модельный образец, контаминированный разведениями стандартных образцов предприятия СОП № 47 ПКО *Enterovirus*-рес и СОП № 243 ПКО *Parechovirus*-рес в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл).

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® *Enterovirus* / *Parechovirus*-FL**

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)
<i>Enterovirus</i>	Фекалии	100 (97,1-100)%	97,2 (94,8-100)%
	Концентраты образцов воды	100 (92,02-100)%	100 (97,1-100)%
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	100 (98,4-100) %	97,5 (95,0-100) %
	Мазки из респираторного тракта	97,4 (92,3-100) %	100 (98,2-100) %
	Мокрота	100 (95,5-100) %	100 (96,4-100) %
	Тканевой материал	100 (92,6-100) %	100 (97-100) %
<i>Parechovirus</i>	Фекалии	100 (95,0-100) %	100 (98,7-100) %
	Концентраты образцов воды	100 (90,8-100) %	100 (97,2-100) %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	100 (93,6-100) %	100 (99,0-100) %
	Мазки из респираторного тракта	100 (92,8-100) %	100 (98,2-100) %
	Мокрота	100 (95,3-100) %	100 (96,5-100) %
	Тканевой материал	100 (92,6-100) %	100 (97,0-100) %

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением 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 МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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 использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. «Транспортная среда для респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

3. Иглы пункционные (например, Gebruder Martin GmbH & Co. KG (Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ), Германия, или аналогичные).
4. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN («КОПАН»), Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
5. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN («КОПАН»), Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
6. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки и жидкости из полости среднего уха у детей и взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).
7. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).

Предварительная подготовка исследуемого материала

8. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ПУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты и другого биологического материала вязкой консистенции.
9. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
10. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
11. Глицерин для длительного хранения биологического материала (фекалий) в условиях низкотемпературной заморозки.
12. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5; 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

- 13.Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
- 14.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
- 15.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
- 16.Штативы для пробирок объемом 1,5; 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
- 17.Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) для проведения пробоподготовки тканевого материала.
- 18.Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
- 19.Вортекс (например, SIA Biosan («СИА Биосан»), Латвия, или аналогичный).
- 20.Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
- 21.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
- 22.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
- 23.Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

- 24.Комплект реагентов для экстракции ДНК/РНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
- 25.Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L»

- 26.Комплект реагентов для обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (РУ № ФСР 2008/03994).
- 27.Дополнительные материалы и оборудование для обратной

транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для обратной транскрипции.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

28. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
29. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
30. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
31. Вортекс (например, SIA Biosan («СИА Биосан»), Латвия, или аналогичный).
32. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
33. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
34. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
35. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
36. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы биологического материала:

- спинномозговая жидкость,
- образцы фекалий,
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды),
- мокрота или аспират из трахеи,
- мазки из респираторного тракта,
- тканевой материал.

Работы по взятию, транспортировке и хранению исследуемого материала должны проводиться в соответствии с показаниями, представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции» или актуальной версии данного документа, действующего на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

Спинномозговая жидкость

Забор СМЖ проводится в первые дни болезни, при наличии клинических показаний, в асептических условиях, с использованием одноразовых пункционных игл в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 1,5 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Допускается хранение образцов спинномозговой жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается транспортирование образцов спинномозговой жидкости при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

Образцы фекалий

Взятие образцов фекалий производится из одноразовой емкости (например, чашка Петри, одноразовый пластиковый пакет), помещенной в судно для дефекации или из одноразовых подгузников (дети младшего возраста). При использовании одноразового подгузника у детей с водянистой консистенцией фекалий для получения достаточного количества образца в подгузник перед использованием помещают ватный тампон.

ВНИМАНИЕ! Не допускается забор образца фекалий непосредственно из судна для дефекации или другой емкости многократного использования (вне зависимости от методов их дезинфекции).

Пробу в количестве примерно 1 г (или 1 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный пластиковый контейнер.

Допускается хранение образцов фекалий до проведения предобработки:

- при комнатной температуре от 18 до 25°С – не более 6 часов;

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование образцов фекалий при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

Концентраты образцов воды (для проведения ПЦР-исследования)

Взятие образцов воды производится в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» и МУК 4.2.1018-01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» или актуальными версиями данных документов, действующими на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

Допускается хранение образцов концентратов воды до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование концентратов образцов воды при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

Мокрота или аспират из трахеи

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

Мазки из респираторного тракта

ВНИМАНИЕ! При взятии мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого сначала берут мазки разными зондами со слизистой оболочки нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мазки со слизистой оболочки нижнего носового хода

Мазки берут сухим стерильным назофарингеальным велью-тампоном на пластиковом аппликаторе. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание.

Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают вниз, 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 (3-4 см для детей и 5-6 см для взрослых).

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда герметично закрывают и маркируют.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование материала при температуре

от 2 до 8 °C в течение 3 суток.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Мазки из ротоглотки 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 500 мкл 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, маркируют.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °C в течение 3 суток.

Тканевой (биопсийный, аутопсийный) материал

Материал отбирают стерильным инструментом (например, пинцет) в стерильный пластиковый контейнер объемом 50 мл с плотно закрывающейся крышкой или пробирку объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала (тканей мозга и внутренних органов):

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование предварительно замороженного материала при температуре от 2 до 8 °C в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Концентраты образцов воды и образцы спинномозговой жидкости не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий, мокроты, мазки из респираторного тракта и тканевой (биопсийный, аутопсийный) материал требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий

Приготовление фекальной суспензии:

1. Отобрать одноразовые пробирки (объемом 1,5 мл), в количестве соответствующем количеству проб. Внести по 1,0 мл PBS (при необходимости хранения суспензии более суток в условиях заморозки используют 15–20 % раствор глицерина в PBS).
2. В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии. Оптимальная концентрация суспензии ~ 10 % (по объему осадка после центрифугирования). Сбросить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе (не более 10 с).

Фекалии водянистой полупрозрачной консистенции используются для экспресс-фильтрации без предварительного получения суспензии.

Проведение экспресс фильтрации фекальной суспензии (для детекции вирусных и бактериальных патогенов):

1. Для экспресс-фильтрации использовать два наконечника на 1 мл (один с фильтром, другой – без него) и отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки).
2. В наконечник без фильтра вставить отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки) и зафиксировать проталкиванием в суженную часть наконечника.
3. Наконечником с фильтром забрать 1 мл фекальной суспензии, вставить его в подготовленный наконечник с ватым фильтром и под давлением провести фильтрацию в новую одноразовую пробирку. При затрудненной фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию фекальной суспензии.
4. Аликвоту фильтрата в объеме 100 мкл используют для экстракции нуклеиновых кислот.

Допускается хранение предобработанных образцов суспензии фекалий до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

Мокрота или аспират из трахеи

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции РНК.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Мазки из респираторного тракта

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.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Тканевой (биопсийный, аутопсийный) материал от человека гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию в 0,9 % растворе натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатном буферном растворе (PBS). Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – не более 6 часов;

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции РНК, ОТ и амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (СМЖ, фекалии, мазки из респираторного тракта, мокрота, тканевой (биопсийный, аутопсийный материал), используемом для исследования.

Были протестированы модельные образцы СМЖ, фекалий, мазков из респираторного тракта, мокроты, аутопсийного материала без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Модельные образцы содержали стандартный образец предприятия, содержащий РНК *Enterovirus*-гес и РНК *Parechovirus*-гес в концентрациях 5×10^3 ГЭ/мл для образцов СМЖ, мазков из респираторного тракта, 1×10^4 ГЭ/мл для образцов фекалий и аутопсийного материала и 3×10^4 ГЭ/мл для образцов мокроты.

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциальног о интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Фекалии	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 40%	Не обнаружено
		Фекальные жиры	до 40%	Не обнаружено

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
	Экзогенные вещества	Муцин (слизь)	до 3%	Не обнаружено
		«Энтерофурил», суспензия для приема внутрь	до 4,25 мг/мл	Не обнаружено
		«Энтеросгель», паста для приема внутрь	до 174,75 мг/мл	Не обнаружено
		Декстрин (Россия)	до 68,6 мг/мл	Не обнаружено
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 4 %	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	«Цефтриаксон», порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения	до 8 мг/мл	Не обнаружено
		Йод, раствор для наружного применения спиртовой 5%	до 0,03%	Не обнаружено
Мазки из респираторного тракта	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 4%	Не обнаружено
		Муцин (слизь)	до 5%	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Мирамистин	до 5%	Не обнаружено
		Люголь раствор с глицерином	до 1%	Не обнаружено
Мокрота	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 4%	Не обнаружено
		Муцин (слизь)	до 5%	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Флюдитек, сироп	до 10 мг/мл	Не обнаружено
Тканевой материал	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 40%	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Формалин 10%-ный нейтральный	до 10%	Не обнаружено
		Дексаметазон, раствор для инъекций	До 0,32 мг/мл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать

только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для экстракции РНК используется комплект реагентов «РИБО-преп». Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL.

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО.

Объем элюции – 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более недели и при температуре не выше минус 68 °С – до года. Допускается однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

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

Для обратной транскрипции используется комплект реагентов «РЕВЕРТА-L». Порядок работы с комплектом реагентов «РЕВЕРТА-L» смотрите в инструкции к комплекту реагентов.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2 – комплект реагентов для амплификации участков кДНК *Enterovirus* и кДНК *Parechovirus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i> / <i>Parechovirus</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К+ <i>Enterovirus</i> / <i>Parechovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* / *Parechovirus*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с

ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* / *Parechovirus*.

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *Enterovirus* / *Parechovirus***;
 - б) **отрицательный контроль 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, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из **ОКО**.

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. 7).

Таблица 7

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
ротормного⁶ и планшетного⁷ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁷ Например, CFX96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

проводятся тесты только для выявления ДНК (кДНК) возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

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 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.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i>	кДНК <i>Parechovirus</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> / <i>Parechovirus</i> НЕ обнаружена
больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	больше или меньше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> обнаружена
больше или меньше граничного	больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Parechovirus</i> обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

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

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов или расположенном на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ПЦР в соответствии с табл. 10 и вкладышем.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемы й этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного
K-	ПЦР	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного. 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, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 10) определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного. 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), 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 (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus / Parechovirus* хранить в защищенном от света месте. Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50-0,2 без разукомплектации при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 месяцев от даты изготовления до вскрытия. После вскрытия «ПЦР-комплект» вариант FRT-50-0,2 разукомплектовать в соответствии с температурами хранения каждого компонента.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

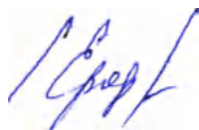
Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁸.

При выявлении побочных действий, не указанных в

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Дата изготовления



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Содержимого достаточно для проведения п тестов



Дата изменения



Использовать до



Предел температуры



Обратитесь к инструкции по применению



Изготовитель



Не допускать воздействия солнечного света

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Доверенность №
178/21 от 16.11.2021 г.)

«11» сентября 2021 г.  А.О.Лисицына

