

«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

« 4 » марта 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® Norovirus GI / GII-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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	9
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА...13	
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК.....	15
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	17
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	17
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	19
СОСТАВ	19
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	19
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР	20
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	21
В. Анализ и интерпретация результатов	22
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	26
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	28

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
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»
Norovirus GI	- норовирус 1 геногруппы
Norovirus GII	- норовирус 2 геногруппы

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® Norovirus GI / GII-FL предназначен для качественного определения и дифференциации РНК норовирусов 1 и 2 геногруппы (Norovirus GI и GII) в биологическом материале (фекалии) и объектах окружающей среды (концентраты образцов воды) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные 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 норовирусную инфекцию вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

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 клиничко-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) и одновременном 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 ТМ-Ревертазы. Амплификация участков кДНК проводится при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды комплементарные участком 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».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции – амплификация кДНК *Norovirus GI*, кДНК *Norovirus GII*, а также амплификация последовательности кДНК ВКО-FL. Результаты амплификации кДНК *Norovirus GI* и кДНК *Norovirus GII*, а также кДНК ВКО-FL регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII	кДНК <i>Norovirus</i> GI
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	gene for capsid protein	gene for capsid protein

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК норовирусов 1 и 2 геногруппы (*Norovirus* GI и GII) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции 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

Выявляемый вирус	Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) ¹ , ГЭ/мл
<i>Norovirus</i> GI	концентраты образцов воды	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³
	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ³
<i>Norovirus</i> GII	концентраты образцов воды	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³
	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ³

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и

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

хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих панелях штаммов микроорганизмов и образцов РНК/ДНК:

1. Норовирусы 1 и 2 геногруппы (*Norovirus* GI – 37 образцов, *Norovirus* GII – 100 образцов) (клинические изоляты, специфичность подтверждена прямым секвенированием нуклеотидных последовательностей);
2. Энтеровирусы человека (представители разных генетических кластеров – *Human echovirus* 2, 6, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 30; *Human coxsackievirus* A4, A5, A6, A9, A16, B4, B5, *Human poliovirus* 1, 2, 3 (Sabin1, Sabin2, Sabin3)); вирусы гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусы, RS вирусы, аденовирусы человека – 3, 5, 7, 37, 40, 41 типов (клинические изоляты, видовая принадлежность подтверждена прямым секвенированием нуклеотидных последовательностей);
3. ДНК человека, штаммы: *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *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 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 (Branhamella) catarrhalis* ATCC® 8176™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *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™, *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® 49619™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6303™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6305™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus salivarius* ATCC® 13419™, *Streptococcus uberis* ATCC® 700407™, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802™, *Vibrio vulnificus* ATCC® 27562™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™, *Corynebacterium minutissimum* ATCC® 23348™.

При проведении тестирования панелей №2 и №3, а также образцов ДНК человека, 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 исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие РНК *Norovirus* GI, РНК *Norovirus* GII в концентрации 1×10^3 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

Вид исследуемого материала	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
<i>Norovirus</i> GI	10	100	40	100
<i>Norovirus</i> GII	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

- 609 образцов фекалий от группы пациентов с диареей, вызванной норовирусной инфекцией 1 и 2 геногрупп. Группа пациентов была отобрана с помощью иммуноферментного метода (набор реагентов для определения норовируса RIDASCREEN *Norovirus* 3rd Generation производства «Р-Биофарм АГ», Германия, РУ № ФСЗ 2009/05901);
- 211 образцов фекалий от группы пациентов с диареей, вызванной кишечными инфекциями другой этиологии, у которых диагноз норовирусной инфекции был не подтвержден иммуноферментным методом (набор реагентов для определения норовируса RIDASCREEN *Norovirus* 3rd Generation производства «Р-Биофарм АГ», Германия, РУ № ФСЗ 2009/05901);

- 200 модельных образцов воды, контаминированных стандартным образцом предприятия, содержащим РНК *Norovirus* GI. Концентрация РНК *Norovirus* GI в модельных образцах составляла 1×10^3 копий/мл;
- 200 модельных образцов воды, контаминированных стандартным образцом предприятия, содержащим РНК *Norovirus* GII. Концентрация РНК *Norovirus* GII в модельных образцах составляла 1×10^3 копий/мл.

В качестве метода сравнения для определения *Norovirus* GI использовался метод прямого секвенирования продуктов амплификации по Сэнгеру. В качестве набора сравнения для детекции *Norovirus* GII использовался набор реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus* / *Norovirus* / *Astrovirus*-FL» (ПУ № ФСР 2008/02268).

Таблица 4

Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Norovirus* GI / GII-FL

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале %	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале %
<i>Norovirus</i> GI	фекалии	98,6-100	98,6-100
	образцы воды	98,5-100	98,5-100
<i>Norovirus</i> GII	фекалии	99,3-100	98,6-100
	образцы воды	98,5-100	98,5-100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ

1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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 клинико-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.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения набора риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по

запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², 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. 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

2. 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).
3. Глицерин для длительного хранения биологического материала (фекалий) в условиях низкотемпературной заморозки.
4. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
10. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
12. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

13. Комплект реагентов для экстракции ДНК/РНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.
14. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

15. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен,

Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

16. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
17. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
19. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
20. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
21. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
22. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
23. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
24. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- образцы биологического материала (фекалий),
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды).

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 1 г (примерно) 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°C – не более 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Концентраты образцов воды (для проведения ПЦР-исследования):

Взятие образцов воды производится в соответствии с МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных 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 °C – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК

Концентраты образцов воды не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий требуют предварительной подготовки.

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 аэрозольным барьером (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 сек).

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 аэрозольным фильтром, другой – без него) и отрезанную рабочую часть ватного зонда (ватной палочки).
2. В наконечник без аэрозольного фильтра вставить отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки) и зафиксировать проталкиванием в суженную часть наконечника.
3. Наконечником с аэрозольным фильтром забрать 1 мл фекальной суспензии, вставить его в подготовленный наконечник с ватным 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 – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование предобработанных образцов суспензии фекалий при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции РНК и реакции 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 кДНК 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 (фекалии), используемом для исследования.

Были протестированы модельные образцы фекалий без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 5. Модельные образцы фекалий содержали разведения стандартных образцов предприятия в концентрациях, соответствующих пределу обнаружения.

Таблица 5

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Цельная кровь	40%	Не обнаружено
	Фекальные жиры	40%	Не обнаружено
	Муцин (слизь)	3% (вес препарата к объему материала)	Не обнаружено
Экзогенные вещества	«Энтерофурил», суспензия для приема внутрь	4,25 мг/мл	Не обнаружено
	«Энтеросгель», паста для приема внутрь (сладкая)	174,75 мг/мл	Не обнаружено
	Декстрин (Россия)	68,6 мг/мл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентой 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 соответствующему 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 – **50-100 мкл**, в зависимости от количества разных наборов реагентов, которыми планируется исследовать полученную РНК.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ-ПЦР 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.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК норовирусов 1 и 2 геногруппы (*Norovirus* GI и GII) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Norovirus</i> GI / GII	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Реввертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
K+ <i>Norovirus</i> GI / GII	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Norovirus* GI / GII**, **5 мкл ПЦР-буфера-С**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**, **0,25 мкл ТМ-Реввертазы (MMIv)**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 1**.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *Norovirus* GI / GII**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *Norovirus* GI / GII**, **ПЦР-буфера-С**, **полимеразы (TaqF)**, **ТМ-Реввертазы (MMIv)**, **RT-G-mix-2**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

7. Поставить контрольные реакции.

а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ *Norovirus* GI / GII**;

- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**;
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси, РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 6, 7)³.

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁴ и планшетного⁵ типов

Цикл	Температура, °С	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,

³ Программы амплификации (табл. 6,7) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁴ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Изготовителем.

⁵ Например, CFX96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Изготовителем.

кроме указанных.

Таблица 7

**Программа амплификации
для приборов роторного⁴ и планшетного⁵ типов**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, JOE, ROX	
	72	10 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 7) может применяться для всего комплекса наборов реагентов «АмплиСенс», предназначенных для выявления и дифференциации ДНК/РНК микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

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 амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого

для проведения ОТ-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>Norovirus</i> GII	кДНК <i>Norovirus</i> GI

Результаты интерпретируют 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 значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 9 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 9

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Значение C_t по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Таблица 10

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение C_t по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
определено меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	РНК <i>Norovirus</i> GI, GII НЕ обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	РНК <i>Norovirus</i> GII обнаружена
определено или отсутствует	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Norovirus</i> GI обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Norovirus</i> GI, GII обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный*

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

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

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. таблицу 9) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых РНК анализируемой мишени не обнаружена. Необходимо повторить амплификацию таких образцов, а для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма, необходимо выполнить действия, указанные в п. 4.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналу для флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла C_t меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 10.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-):
 - а) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.
 - б) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии, требуется повторно провести амплификацию 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. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *Norovirus* GI / GII, ПЦР-буфер-С, RT-G-mix-2, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Norovirus* GI / GII хранить в защищенном от света месте.

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.ru⁶.

При выявлении побочных действий, не указанных в 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.

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Схема приготовления реакционных смесей при использовании ПЦР-комплекта вариант FRT-50 F для ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное количество реакций				
		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ⁷	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Реввертаза (MMIv)
2	6	60	30	1,5	3,0	1,5
4	8	80	40	2,0	4,0	2,0
6	10	100	50	2,5	5,0	2,5
8	12	120	60	3,0	6,0	3,0
10	14	140	70	3,5	7,0	3,5
12	16	160	80	4,0	8,0	4,0
14	18	180	90	4,5	9,0	4,5
16	20	200	100	5,0	10,0	5,0
18	22	220	110	5,5	11,0	5,5
20	24	240	120	6,0	12,0	6,0
22	26	260	130	6,5	13,0	6,5
24	28	280	140	7,0	14,0	7,0
26	30	300	150	7,5	15,0	7,5
28	32	320	160	8,0	16,0	8,0

⁷ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК) и ОТ-ПЦР (К+, К-) + запас на один образец.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
«15» апреля 2022 г.

лист(ов) (а)
В.Г. Акимкин



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



Краткое руководство

набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® Norovirus GI / GII-FL

Форма 1: **REF** H-2751-1-3

 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 (ОК) контроль экстракции.

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 (отрицательного контроля экстракции)

Элюция

все образцы	50-100 мкл ¹	в каждую пробирку
-------------	-------------------------	-------------------

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ-ПЦР 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.

¹ Объем зависит от количества разных наборов реагентов, которыми планируется исследовать полученную РНК

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы РНК (10 мкл).
Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный (ОК) контроль экстракции.

- 1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- 2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Norovirus GI / GII*.
- 3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Norovirus GI / GII</i>	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	
ТМ-Ревертаза (MMIv)	0,25*(N+K+1)	
RT-G-mix-2	0,25*(N+K+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

- 4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК
Пробы РНК, экстрагированной из ОК	
К+ <i>Norovirus GI / GII</i>	в пробирку для К+
К-	в пробирку для К-

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

- 5. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени»².

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.

Цикл	Программа амплификации ³				Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Темпера- тура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Темпера- тура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	30 мин	—	1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	45	95	10 с	—	45
	60	25 с	FAM, JOE, ROX		60	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	10 с	—					

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

- 6. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! При неполной загрузке приборов планшетного типа установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- 7. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

² Программы амплификации равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
³ Данная программа может применяться для всего комплекса наборов реагентов «АмплиСенс», предназначенных для выявления и дифференциации ДНК/РНК микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора. При одновременном проведении других тестов назначается детекция

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Флуорофор	FAM	JOE	ROX
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII	кДНК <i>Norovirus</i> GI

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 РНК значения порогового цикла (*Ct*).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения *Ct*, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3

лист 1 из 4



Директор ФБУН ЦНИИ

Эпидемиологии

Роспотребнадзора

«19» сентября 2022 г.

М.П.

В.Г. Акимкин

11