

«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

« 13 » июля 20 12 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления возбудителей
вирусных кишечных инфекций методом ПЦР

АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL

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	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК	17
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	20
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	20
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	22
СОСТАВ.....	22
РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК/кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР.....	23
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».....	24
В. Анализ и интерпретация результатов	25
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	31
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
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 гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
PBS	- фосфатно-солевой буфер

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL предназначен для качественного определения и дифференциации РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 1 и 2 геногруппы (*Norovirus GI* и *GII*), астровирусов (*Astrovirus*) и ДНК аденовирусов группы F (*Adenovirus F*) в биологическом материале (фекалии) и объектах окружающей среды (концентраты образцов воды) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы ДНК/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 кишечную инфекцию вне

зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для исследования объектов окружающей среды.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК/РНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков ДНК/кДНК выявляемых вирусов (*Rotavirus A*, *Norovirus GI* и *GII*, *Astrovirus*, *Adenovirus F*) 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.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК/РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента Реввертазы (MMIV) и амплификация участков ДНК/кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК/кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это 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 пять реакций – амплификация кДНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 1 и 2 геногруппы (*Norovirus GI* и *GII*), астровирусов (*Astrovirus*), ДНК аденовирусов группы F (*Adenovirus F*), а также амплификация последовательности

кДНК ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК/кДНК выявляемых вирусов, а также кДНК ВКО-FL регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК/кДНК-мишень	кДНК ротавирусов группы А (Rotavirus A)	кДНК норовирусов 1 и 2 геногруппы (Norovirus GI и GII)	ДНК аденовирусов группы F (Adenovirus F)	кДНК ВКО-FL	кДНК астровирусов (Astrovirus)
Область амплификации	NSP2	genes for capsid proteins	hexon	искусственная нуклеотидная последовательность	gene for capsid protein

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации ДНК/кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК/РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК/РНК.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Микроорганизм	Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК/РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл ¹
Ротавирусы группы А (<i>Rotavirus A</i>)	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ⁴
	концентраты образцов воды			5x10 ³
Норовирусы 1 и 2 геногруппы (<i>Norovirus GI</i> и <i>GII</i>)	фекалии		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ³
	концентраты образцов воды			1x10 ³
Астровирусы (<i>Astrovirus</i>)	фекалии		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ⁴
	концентраты образцов воды			5x10 ³
Аденовирусы группы F (<i>Adenovirus F</i>)	фекалии		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ⁴
	концентраты образцов воды			5x10 ³

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК/РНК заявленных микроорганизмов: норовирусы 1 и 2 геногруппы (*Norovirus GI*, *Norovirus GII*), ротавирусы группы А (*Rotavirus A*) (ротавирусы различных [P]G типов), астровирусы (*Astrovirus*), аденовирусы группы F (*Adenovirus F*) (клинические изоляты, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов:

1. РНК энтеровирусов человека (представители разных генетических кластеров – *Human echovirus* 2, 6, 9, 11, 14, 16, 17,

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

- 18, 30; *Human coxsackievirus* A6, A9, B4, B5 (клинические изоляты, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей), *Human poliovirus* 1, 2, 3 (вакцинные штаммы)) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл;
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) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл (клинические изоляты, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей);
3. штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *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 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™, *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 тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных организмов и 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, воспроизводимость

Повторяемость и воспроизводимость были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие РНК *Rotavirus grA*, РНК *Astrovirus*, ДНК *Adenovirus grF* с концентрациями 5×10^3 ГЭ/мл каждого, РНК *Norovirus GI*, РНК *Norovirus GII* с

концентрациями 1×10^3 ГЭ/мл каждого, 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 разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов.

Результаты представлены в табл. 3

Таблица 3

Образцы	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
<i>Norovirus</i> GI	10	100	30	100
<i>Norovirus</i> GII	10	100	30	100
<i>Rotavirus</i> A	10	100	30	100
<i>Astrovirus</i>	10	100	30	100
<i>Adenovirus</i> F	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL в сравнении с референтным методом

Тип образцов		Результаты применения АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL		Результаты применения референтного метода ²	
				положительных	отрицательных
Фекалии	Всего исследовано 660 образцов	Rotavirus A	положительных	201	8
			отрицательных	3	448
		Norovirus GI	положительных	113	0
			отрицательных	0	547
		Norovirus GII	положительных	192	2
			отрицательных	1	465
		Astrovirus	положительных	138	9
			отрицательных	0	513
		Adenovirus F	положительных	115	1
			отрицательных	7	537
Концентраты образцов воды	Всего исследовано 357 образцов	Rotavirus A	положительных	104	0
			отрицательных	0	162
		Norovirus GI	положительных	91	0
			отрицательных	0	162
		Norovirus GII	положительных	104	0
			отрицательных	0	162
		Astrovirus	положительных	104	0
			отрицательных	0	162
		Adenovirus F	положительных	104	0
			отрицательных	0	162

Были использованы:

- 626 образцов фекалий от пациентов с острыми кишечными инфекциями (из очагов групповой заболеваемости и спорадических случаев кишечных инфекций);
- 34 образца фекалий, отрицательных по содержанию вирусных патогенов, получены от пациентов с острыми кишечными инфекциями в период 2009-2015 гг.;
- 91 модельный образец концентратов воды, контаминированный стандартным образцом предприятия, содержащим РНК *Norovirus GI* в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл и 1×10^3 ГЭ/мл;
- 104 модельных образца концентратов воды, контаминированных стандартным образцом предприятия,

² В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» (ПУ № ФСР 2008/02265).

- содержащим РНК *Norovirus* GI в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл и 1×10^3 ГЭ/мл, РНК *Rotavirus* A, *Astrovirus* и ДНК *Adenovirus* F в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл и 5×10^3 ГЭ/мл каждого;
- 162 модельных образца концентратов воды, не содержащих РНК *Rotavirus* A, *Norovirus* GI, GII, *Astrovirus*, ДНК *Adenovirus* F.

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL**

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)
<i>Rotavirus</i> A	Фекалии	98,5 (96,8–100)%	98,25 (97,0–100)%
	Концентраты образцов воды	100 (97,2–100)%	100 (98,2–100)%
<i>Norovirus</i> GI	Фекалии	100 (97,4–100)%	100 (99,5–100)%
	Концентраты образцов воды	100 (96,8–100)%	100 (98,2–100)%
<i>Norovirus</i> GII	Фекалии	99,48 (98,5–100)%	99,57 (99,0–100)%
	Концентраты образцов воды	100 (97,2–100)%	100 (98,2–100)%
<i>Astrovirus</i>	Фекалии	100 (98,0–100)%	98,28 (97,2–100)%
	Концентраты образцов воды	100 (97,2–100)%	100 (98,2–100)%
<i>Adenovirus</i> F	Фекалии	94,26 (90,1–100)%	99,81 (99,4–100)%
	Концентраты образцов воды	100 (97,2–100)%	100 (98,2–100)%

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,

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения 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, 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. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).

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 заворачивающиеся или

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

- плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)).
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)).
 6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/12077)).
 7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/12077)).
 8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)).
 9. Вортекс (например, SIA Biosan (ООО «Биосан»), Латвия (РУ № ФСЗ 2011/09797)).
 10. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия (РУ № ФСЗ 2012/12201); АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия (РУ № ФСР 2007/01433, РУ № ФСР 2007/01095); Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия (РУ № ФСЗ 2011/11028)).
 11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК/РНК из исследуемых образцов

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

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

16. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)) – 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 (РУ № ФСЗ 2012/11892)) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)) – при использовании прибора роторного типа.
17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/12077)).
18. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2012/11892)).
19. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия (РУ № ФСР 2010/07111)).
20. Вортекс (например, SIA Biosan (ООО «Биосан»), Латвия (РУ № ФСЗ 2011/09797)).
21. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия (РУ № ФСЗ 2012/12201); АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия (РУ № ФСР 2007/01433, РУ № ФСР 2007/01095); Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия (РУ № ФСЗ 2011/11028)).
22. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) (РУ № ФСЗ 2008/03399)).
23. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24

до минус 16 °С.

24. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

25. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- образцы 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 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 – в течение 1 недели.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/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 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-фльтрации без предварительного получения суспензии.

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

1. Для экспресс-фльтрации 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 аэрозольным 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 – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается 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 ДНК/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 потенциального интерферирующего вещества указана в табл. 6. Модельные образцы фекалий содержали разведения стандартных образцов предприятия в концентрациях, соответствующих пределу обнаружения.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 40% (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	Фекальные жиры	до 40% (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	Муцин (слизь)	до 3% (вес препарата к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
Экзогенные вещества	«Энтерофурил», суспензия для приема внутрь (Босналек АО, Босния и Герцеговина)	до 4,25 мг/мл	Не обнаружено
	«Энтеросгель», паста для приема внутрь (сладкая) («ТНК СИЛМА», Россия)	до 174,75 мг/мл	Не обнаружено
	Декстрин (Россия)	до 68,6 мг/мл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/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 ДНК/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 ДНК/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-ПЦР рекомендуется проводить сразу после получения проб ДНК/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 ДНК/РНК.

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участков ДНК/кДНК выявляемых вирусов (*Rotavirus A*, *Norovirus GI* и *GII*, *Astrovirus*, *Adenovirus F*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL ОКИ виро-скрин	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-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ ОКИ виро-скрин	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

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.

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

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК/кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые 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 ДНК/РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL ОКИ виро-скрин, 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 ОКИ виро-скрин.** Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL ОКИ виро-скрин, 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 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 ДНК/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 (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ ОКИ виро-скрин**;
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**;
- а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК/РНК-пробы и контролей.

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. 7, 8)⁶.

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁷ и планшетного⁸ типа

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, Cy5, Cy5.5	

⁶ Программы амплификации (табл. 7, 8) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁷ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁸ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁸ и планшетного⁹ 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, Cy5, Cy5.5	
	72	10 с	–	

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 8) 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.

- 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.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 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 ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального

времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Таблица 9

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	кДНК ротавирусов группы A (<i>Rotavirus A</i>)	кДНК норовирусов 1 и 2 геногруппы (<i>Norovirus GI</i> и <i>GII</i>)	ДНК аденовирусов группы F (<i>Adenovirus F</i>)	кДНК ВКО-FL	кДНК астровирусов (<i>Astrovirus</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 ДНК/РНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 10

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение C_t по каналу для флуорофора					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного значения	отсутствует или определено больше граничного	РНК ротавирусов группы A (<i>Rotavirus A</i>) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного значения	отсутствует или определено больше граничного	РНК норовирусов 1 и 2 геногруппы (<i>Norovirus GI</i> и <i>GII</i>) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	больше или меньше граничного значения	отсутствует или определено больше граничного	ДНК аденовирусов группы F (<i>Adenovirus F</i>) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	больше или меньше граничного значения	<u>определено</u> меньше граничного	РНК астровирусов (<i>Astrovirus</i>) обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	ДНК/РНК вирусов НЕ обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	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 ДНК/РНК.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР в соответствии с табл. 11 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 11

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение C_t по каналу для флуорофора				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
OK	Экстракция ДНК/РНК	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного
K-	ОТ-ПЦР	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного
K+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 11) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК/РНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по какому-либо из каналов для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t) менее 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 ДНК/РНК, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.

3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t) менее 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 ДНК/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. 15 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 ОКИ виро-скрин, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv), RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ОКИ виро-скрин 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.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно
для проведения п тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции
по применению



Дата изменения



Не допускать
воздействия солнечного
света



Предел температуры



Дата изготовления



Изготовитель



Осторожно!

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

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

		Объем реагентов на указанное количество реакций				
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ⁹	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (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
30	34	340	170	8,5	17,0	8,5
32	36	360	180	9,0	18,0	9,0

⁹ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроль этапа экстракции (ОК) и ОТ-ПЦР (К+, К-) + запас на один образец.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 32

тридцать два)

лист а

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



11 20.11.21 г.

М.П.

А.О.Лисицына

[Signature]