

«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

«14» Октября 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® *Human enterovirus-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	4
НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	20
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	22
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 ДЕТЕКЦИЯ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	24
СОСТАВ	24
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ.....	24
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	24
А. Подготовка проб для амплификации	24
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	27
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 ДЕТЕКЦИЯ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	30
СОСТАВ	30
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ.....	30
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	30
А. Подготовка проб для амплификации	30
Б. Проведение амплификации	31
В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»	32
Г. Интерпретация результатов	32
ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F ДЕТЕКЦИЯ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	35
СОСТАВ	35
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	35
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР	36
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени	37
В. Анализ и интерпретация результатов	38
ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F ДЕТЕКЦИЯ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	41
СОСТАВ	41
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	42
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР.....	42
Б. Проведение ОТ-ПЦР	43
В. Флуоресцентная детекция продуктов ОТ-ПЦР по «конечной точке».....	44
Г. Интерпретация результатов.....	44
ФОРМА 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	47
СОСТАВ	47

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	47
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР.....	47
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	48
В. Анализ и интерпретация результатов.....	49
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	53
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	54
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	55
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.	56
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	57

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, полученная в ходе реакции обратной транскрипции
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
СМЖ	- спинномозговая жидкость
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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
EV	- <i>Enterovirus</i> (Энтеровирус)
EV 71	- <i>Enterovirus</i> 71 типа (Энтеровирус 71 типа)
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
PBS	- фосфатно-солевой буфер

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® *Human enterovirus-FL* предназначен для качественного определения РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) видов/кластеров А, В, С, D (*Human coxsackievirus A*, *Human coxsackievirus B*, *Human echovirus*, *Human poliovirus*, *Human enterovirus* 68-71, 73-78, 89-91), без дифференцировки между ними, в биологическом материале (фекалии, спинномозговая жидкость, мазки из респираторного тракта) и объектах окружающей среды (концентраты образцов воды) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на энтеровирусную 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 допускается только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

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

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента Ревертазы (MMIV). Амплификация участка кДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых кДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала либо с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», либо с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора после окончания ПЦР – детекция по «конечной точке».

Набор реагентов в форме 1 содержит систему защиты от

контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе ПЦР одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (<i>Human enterovirus</i>)
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	5'UTR

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F

Форма 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

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

Формы 2 и 3 предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» (форма 2) и в режиме «реального времени» (формы 2 и 3) и позволяют выявлять РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК.

Формы 1 и 2 рассчитаны на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 3 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для обратной транскрипции, амплификации и детекции		Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) ¹ , ГЭ/мл
Спинномозговая жидкость (СМЖ), концентраты образцов воды, мазки из респираторного тракта	«РИБО-преп»	«РЕВЕРТА-L»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2	5x10 ³
		—	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F и вариант FRT-L	
Фекалии		«РЕВЕРТА-L»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2	1x10 ⁴
		—	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F и вариант FRT-L	

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки РНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих штаммов микроорганизмов:

1. РНК энтеровирусов человека (представителей разных генетических кластеров – *Human echovirus* 2, 5, 6, 9, 11, 14, 16, 17, 18, 27, 30; *Human coxsackievirus* A4, A5, A6, A9, A16, B3, B4, B5; EV71) (клинические изоляты, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей), *Human poliovirus* 1, 2, 3 (вакцинные штаммы) в концентрации не менее 1x10⁴ ГЭ/мл. При тестировании образцов РНК вышеперечисленных

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

штаммов/клинических изолятов были получены положительные результаты.

2. РНК вирусов гриппа А (H3N2 (NCBI:txid2029290), H1N1 (NCBI:txid1898984)), В, риновирусов, RS вирусов, ДНК аденовирусов человека – 3 типа (GenBank: FJ167580.1), 5 типа (GenBank: FJ167596.1), 7 типа (GenBank: KU361344.1), 37 типа (GenBank: AY048776.1), 40 типа (GenBank: FJ167570.1), 41 типа (GenBank: FJ167574.1) (в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл) (клинические изоляты, специфичность 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™, *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 gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Peptoniphilus* (*Peptostreptococcus*) *anaerobius* ATCC® 27337™, *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* ATCC® 6538P™, *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® 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 mimutissimum* ATCC® 23348™.

При тестировании панелей №2 и №3, а также образцов ДНК плаценты 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 исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведение стандартного образца предприятия, содержащего РНК *Enterovirus*, с концентрацией 5×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

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

Результаты представлены в табл.3.

Таблица 3

«АмплиСенс® Human enterovirus- FL»	Формат тести- рования	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
			Количество образцов	Совпадение результатов , %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Форма 1	FRT	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	FEP	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
Форма 2	FRT	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
	FEP	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100
Форма 3	FRT-L	Положительные	10	100	30	100
		Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® Human enterovirus-FL в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® Human enterovirus-FL		Результаты применения референтного метода ²	
			положительны х	отрицательны х
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	Всего исследовано 900 образцов	положительных	470	0
		отрицательных	0	430
Фекалии	Всего исследовано 540 образцов	положительных	260	0
		отрицательных	0	280
Концентраты образцов воды	Всего исследовано 510 образца	положительных	230	0
		отрицательных	0	280
Мазки из респираторного тракта	Всего исследовано 540 образцов	положительных	260	0
		отрицательных	0	280

² В качестве метода сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® Enterovirus-FL» (РУ № ФСР 2008/02264).

Для оценки диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

- 900 образцов СМЖ от пациентов с серозными менингитами и пациентов с гнойными бактериальными менингитами в период 2007-2011 гг.;
- 540 образцов фекалий от пациентов с серозными менингитами и клинически здоровых лиц (амбулаторно вакцинируемые дети) в период 2013-2018 гг.;
- 510 концентратов образцов воды (280 образцов, полученных из субъектов РФ в рамках деятельности Российского Референс-центра по мониторингу возбудителей кишечных инфекций 2015-2019 гг., и 230 модельных образцов, контаминированных разведением стандартного образца предприятия, содержащего РНК *Enterovirus* в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл);
- 540 мазков из респираторного тракта пациентов с серозными менингитами и от пациентов с ОРВИ различной этиологии 2014-2019 гг.

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® Human enterovirus-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ (с доверительной вероятностью 95 %)
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	100 (99,4 – 100)%	100 (99,3 – 100)%
Фекалии	100 (98,9 – 100)%	100 (98,9 – 100)%
Концентраты образцов воды	100 (98,7 – 100)%	100 (98,9 – 100)%
Мазки из респираторного тракта	100 (98,9 – 100)%	100 (98,9 – 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

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении

вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

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. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5, 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
2. Иглы пункционные (например, Gebruder Martin GmbH & Co. KG (Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ), Германия).
3. Гибкий велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия (РУ № ФСЗ 2010/07660)).
4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).

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

Предварительная подготовка исследуемого материала

5. «Транспортная среда для респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011).
6. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
7. 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; рН=7,5±0,2).
8. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5, 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 и 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
12. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
13. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
15. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
16. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

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

Обратная транскрипция с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L»

19. Комплект реагентов для обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ПУ № ФСР 2008/03994).

20.Дополнительные материалы и оборудование для обратной транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для обратной транскрипции.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

21.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

22.Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл, или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

23.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

24.Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).

25.Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).

26.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

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

28.Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При проведении детекции по «конечной точке»:

29.Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – для приготовления реакционной смеси.

б) пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора, например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

30.Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (ПУ № ФСР 2007/01275)), MaxyGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США)).

31.Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия), «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (ПУ № ФСР 2007/01249))).

При проведении детекции в режиме «реального времени»:

32. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) – 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) – 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) – при использовании прибора роторного типа.

33. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (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))).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- спинномозговая жидкость,
- образцы фекалий,
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды),
- мазки из респираторного тракта.

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

исследований.

Спинномозговая жидкость

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

Допускается хранение образцов спинномозговой жидкости до проведения ПЦР-исследования:

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

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

Образцы фекалий

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

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

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

Допускается хранение образцов фекалий до проведения предобработки:

- при температуре от 18 до 25°С – не более 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Объекты окружающей среды (концентраты образцов воды) (для

проведения ПЦР-исследования)

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

Допускается хранение образцов концентратов воды до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Мазки из респираторного тракта

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

Мазки со слизистой оболочки нижнего носового хода

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

Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают вниз, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от

ноздри до ушного отверстия (3-4 см для детей и 5-6 см для взрослых).

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

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Концентраты образцов воды и образцы спинномозговой жидкости и мазки из респираторного тракта 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-фильтрации без предварительного получения суспензии.

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

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

экстракции нуклеиновых кислот.

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

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование 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, ОТ 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 ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (СМЖ, фекалии, мазки из респираторного тракта), используемом для исследования (см. табл. 6).

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

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Фекалии	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 40% объем/объем	Не обнаружено
		Фекальные жиры	до 40% объем/объем	Не обнаружено
		Муцин (слизь)	до 3% вес препарата к объему материала	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	«Энтерофурил», суспензия для приема внутрь	до 4,25 мг/мл	Не обнаружено
		«Энтеросгель», паста для приема внутрь (сладкая)	до 174,75 мг/мл	Не обнаружено
		Декстрин	до 68,6 мг/мл	Не обнаружено
СМЖ	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 4% объем/объем	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения	до 8 мг/мл вес препарата к объему материала	Не обнаружено
		Йод, раствор для наружного применения спиртовой 5%	до 0,03% объем/объем	Не обнаружено
Мазки из респираторного тракта	Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 4% объем/объем	Не обнаружено
		Муцин (слизь)	до 5% вес препарата к объему материала	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Мирамистин	до 5% объем/объем	Не обнаружено
		Люголя раствор с глицерином	до 1% объем/объем	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

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

Объем ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

Объем элюции:

- **50 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2, «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50 F);
- **125 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L. Допускается использование Буфера для элюции А, входящего в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ/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 однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 ДЕТЕКЦИЯ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 – комплект реагентов для амплификации участка кДНК *Enterovirus* (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i> раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-буфер-А-Фон ⁶	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
К+ <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

⁶ Реагент используется только в случае амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Enterovirus*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. В пробирки исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-FL *Enterovirus***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *Enterovirus***.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы**, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из **ОКО**.

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

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

Таблица 7

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
ротаторного⁷ и планшетного⁸ типа**

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

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

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.

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

⁸ Например, CFX96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (<i>Human enterovirus</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 значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение C_t по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> НЕ обнаружена
больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> обнаружена
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.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов

экстракции и ПЦР в соответствии с табл. 10 и вкладываем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*).
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график

представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 ДЕТЕКЦИЯ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 – комплект реагентов для амплификации участка кДНК *Enterovirus* (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i> раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-буфер-А-Фон ⁹	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
К+ <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-

⁹ Реагент используется только в случае амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

FL Enterovirus для амплификации кДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 5), а также двух образцов «Фон». Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.

2. Приготовить образцы «Фон». Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-FL Enterovirus** на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-буфера-А-Фон**.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С в защищенном от света месте и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии и того же типа ПЦР-пробирок.

3. В пробирки исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-FL Enterovirus**.
4. В подготовленные пробирки внести (кроме пробирок с образцами «Фон») по **10 мкл проб кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ Enterovirus**;
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**;
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы**, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из **ОКО**.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 11).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание – Рекомендуется перед постановкой в амплификатор 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.

Таблица 11

Программа амплификации

Для амплификаторов группы 1 ¹⁰				Для амплификаторов группы 2 ¹¹		
Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
0	95	пауза		95	пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	42	95	10 с	42
	60	10 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	72	1 мин	1	72	1 мин	1
4	10	хранение		10	хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам (см. табл. 12).

Таблица 12

Соответствие мишеней и каналов для флуорофора

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (Human enterovirus)

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов).

Г. Интерпретация результатов

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

¹⁰ GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems Group of The Applied Biosystems Corporation, США) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹¹ MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие, рекомендованные Изготовителем.

Результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам детекции. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Таблица 13

**Интерпретация результатов анализа
исследуемых образцов**

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	РНК <i>Enterovirus</i> обнаружена
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	РНК <i>Enterovirus</i> НЕ обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Невалидный*
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Сомнительный**

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

В случае получения **сомнительного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения флуоресцентных сигналов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ПЦР в соответствии с табл. 14 и пороговыми значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 14

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
К–	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
К+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения положительного результата. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*).
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE сигнал выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора JOE сигнал выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.

ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FER/FRT-50 F ДЕТЕКЦИЯ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FER/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК *Enterovirus* (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i>	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+ <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ¹²	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	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 пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от

¹² Используется только в случае амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» с применением амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

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 проб 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 *Enterovirus*, 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,5 мкл полимеразы (TaqF), 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (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 *Enterovirus*. Перемешать содержимое всех пробирок ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL *Enterovirus*, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (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 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+ *Enterovirus***.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.
- 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 с РНК-пробами и контролями. Время внесения проб в реакционную смесь и запуска 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. 15).

Таблица 15

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного¹³ и планшетного¹⁴ типа

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

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме

¹³ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹⁴ Например, CFX96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

указанных.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

2. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

Таблица 16

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (<i>Human enterovirus</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 значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 17

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение C_t по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> НЕ обнаружена
больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> обнаружена
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.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР в соответствии с табл. 18 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 18

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Значение C_t по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного
K-	ОТ-ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
K+	ОТ-ПЦР	<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 каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*).
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (K-) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация

лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FER/FRT-50 F ДЕТЕКЦИЯ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FER/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК *Enterovirus* (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i>	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+ <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ¹⁵	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	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.

¹⁵ Реагент используется только в случае амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» с применением амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free». Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР

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

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL *Enterovirus*, 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,5 мкл полимеразы (TaqF), 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv), 0,25 мкл RT-G-mix-2. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7), а также двух образцов «Фон». Для приготовления реакционной смеси реагенты берутся с запасом на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Enterovirus*. Перемешать содержимое всех пробирок ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок для ОТ-ПЦР с учетом количества исследуемых, контрольных образцов и двух образцов «Фон».
4. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь ПЦР-смеси-FL *Enterovirus*, ПЦР-буфера-С и RT-G-mix-2 согласно расчетной таблице, приведенной в приложении 2, осадить капли на вортексе;
 - Добавить в две пробирки «Фон» по 15 мкл приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)) и по 10 мкл К-. Сверху добавить по 1 капле минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.

- В оставшуюся часть реакционной смеси добавить необходимое количество **полимеразы (TaqF)** и **ТМ-Ревертазы (MMIv)** согласно расчетной таблице, приведенной в **Приложении 2**. Перемешать и осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv), указанное в **Приложении 2**, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

5. В пробирки, подготовленные для исследуемых и контрольных образцов, внести по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Сверху добавить по **1 капле минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ Enterovirus**.
 - б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – 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 с РНК-пробами и контролями. Время внесения проб в реакционную смесь и запуска реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ОТ-ПЦР

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 19).
2. Запустить выполнение программы амплификации.

Примечание – Рекомендуется перед постановкой в амплификатор 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.

Таблица 19

Программа амплификации

Для амплификаторов группы 1 ¹⁶				Для амплификаторов группы 2 ¹⁷		
Цикл	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	42	95	10 с	42
	60	10 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
4	72	1 мин	1	72	1 мин	1
5	10	хранение		10	хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов ОТ-ПЦР по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 20

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (Human enterovirus)

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов).

Г. Интерпретация результатов

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

Результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по

¹⁶ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹⁷ MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие, рекомендованные Изготовителем.

соответствующим каналам детекции. Интерпретация производится автоматически, с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Таблица 21

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	РНК <i>Enterovirus</i> обнаружена
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	РНК <i>Enterovirus</i> НЕ обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Невалидный*
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Сомнительный**

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

В случае получения **сомнительного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения флуоресцентных сигналов 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. 22 и пороговыми значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 22

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
К–	ОТ-ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
К+	ОТ-ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения положительного результата. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*).
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE сигнал выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) по каналу для флуорофора JOE сигнал выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.

ФОРМА 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК *Enterovirus* (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>Enterovirus-Lyo</i>	Порошок белого цвета	—	96 пробирок или стрипованных пробирок объемом 0,2 мл
К+ <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ 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». Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *Enterovirus-Lyo* для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ *Enterovirus***.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 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 с РНК-пробами и контролями. Время внесения проб в реакционную смесь и запуска 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. 23).

Таблица 23

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного¹⁸ и планшетного¹⁹ типа**

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

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

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 результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые

¹⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹⁹ Например, CFX96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 24

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus (Human enterovirus)</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 значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 25

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение C_t по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> НЕ обнаружена
больше или меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Enterovirus</i> обнаружена
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.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР в соответствии с табл. 26 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 26

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*).
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию).

Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2 без разуккомплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus*, 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 *Enterovirus* хранить в защищенном от света месте.

Форма 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь *Enterovirus*-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь *Enterovirus*-Lyo 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 по качеству 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема приготовления реакционных смесей при использовании ПЦР-комплекта вариант FEP/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 ²⁰	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

²⁰ Количеств реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапов экстракции (ОК) и ОТ-ПЦР (К+, К-) + запас на один образец.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Схема приготовления реакционных смесей при использовании ПЦР-комплекта вариант FEP/FRT-50 F для проведения ОТ-ПЦР с детекцией по «конечной точке»

		Этап 1. Смесь из трех компонентов с учетом двух образцов «Фон» ²¹			Этап 2. Внесение ферментов в смесь на указанное кол-во реакций после отбора смеси на 2 образца «Фон» (мкл)	
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ²²	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	TM-Ревертаза (MMiv)
2	8	80	40	2,0	3,0	1,5
4	10	100	50	2,5	4,0	2,0
6	12	120	60	3,0	5,0	2,5
8	14	140	70	3,5	6,0	3,0
10	16	160	80	4,0	7,0	3,5
12	18	180	90	4,5	8,0	4,0
14	20	200	100	5,0	9,0	4,5
16	22	220	110	5,5	10,0	5,0
18	24	240	120	6,0	11,0	5,5
20	26	260	130	6,5	12,0	6,0
22	28	280	140	7,0	13,0	6,5
24	30	300	150	7,5	14,0	7,0
26	32	320	160	8,0	15,0	7,5
28	34	340	170	8,5	16,0	8,0

²¹ Объем реагентов на указанное количество реакций без полимеразы (TaqF) и TM-Ревертазы (MMiv).

²² Количеств реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК) и ОТ-ПЦР (К+, К-) + 2 образца «Фон» + запас на один образец.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Дата изготовления



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Дата изменения



Использовать до



Предел температуры



Обратитесь к инструкции по применению



Изготовитель



Не допускать воздействия солнечного света



Беречь от влаги

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 54
пятнадцать лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)

А.О. Лисенкина А.О. Лисенкина

03 20 23 г.





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



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® Human enterovirus-FL

Форма 1: **REF** H-2771-3-2



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



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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп».

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

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

ВНИМАНИЕ! Для фекалий требуется предварительная обработка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

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

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

Комплекты для обратной транскрипции:

- «РЕВЕРТА-L».

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2

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

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

- Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* для исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	45
	60	20 с	FAM, JOE	

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

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (<i>Human enterovirus</i>)

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

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2

Общий объем реакционной смеси: 30 мкл, включая объем пробы кДНК (10 мкл).
Контроли: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).
- Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *Enterovirus* для ПЦР исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.

Внести по 20 мкл	
ПЦР-буфера-А-Фон	в две пробирки «Фон» на поверхность воска
ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С в защищенном от света месте и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии и того же типа ПЦР-пробирок.	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфера-К	в каждую пробирку для исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL <i>Enterovirus</i>
Проб кДНК, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы кДНК, полученной в результате экстракции и обратной транскрипции из ОКО	в пробирку для ОК
K+ <i>Enterovirus</i>	в пробирку для К+
K-	в пробирку для К-

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

- Запрограммировать амплификатор и запустить выполнение программы.
- Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.
Примечание – Рекомендуется перед постановкой в амплификатор 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.

Цикл	Для амплификаторов группы 1 ¹			Для амплификаторов группы 2 ²		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	пауза		95	пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	42	95	10 с	42
	60	10 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	72	1 мин	1	72	1 мин	1
4	10	хранение		10	хранение	

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (<i>Human enterovirus</i>)

Интерпретация производится автоматически, с помощью программного обеспечения используемого прибора.
ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов).

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: ✓
169 лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)

А.О.Лисицына 20 22 г. А.О.Лисицына





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



Краткое руководство

набор реагентов **АмплиСенс® Human enterovirus-FL**

Форма 2:

REF H-2772-3



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 контроль экстракции (ОК).

ВНИМАНИЕ! Для фекалий требуется предварительная обработка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

ВНИМАНИЕ! 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 однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы РНК (10 мкл).

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

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

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

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

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР 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
Пробы РНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК
K+ <i>Enterovirus</i>	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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

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

ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

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

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

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора и запустить прибор.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (Human enterovirus)

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

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы РНК (10 мкл).

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный (OK) контроль экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i>	$10 \cdot (N+K+F+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; F – количество образцов «Фон» 1 – запас
ПЦР-буфер-С	$5 \cdot (N+K+F+1)$	
RT-G-mix-2	$0,25 \cdot (N+K+F+1)$	

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

- Добавить в две пробирки «Фон» по **15 мкл** приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)) и по **10 мкл K-**. Сверху добавить по 1 капле **минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.
- В оставшуюся часть реакционной смеси добавить необходимое количество **полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)**.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ТМ-Ревертаза (MMIv)	$0,25 \cdot (N+K+1)$	

Перемешать и осадить капли на вортексе.

- Отобрать необходимое количество пробирок для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных проб:

Внести по 15 мкл	
приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку. Сверху добавить по 1 капле минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки
Внести по 10 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы РНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для OK
K+ <i>Enterovirus</i>	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

- Запрограммировать амплификатор и запустить выполнение программы.

Примечание – Рекомендуется перед постановкой в амплификатор 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.

Цикл	Для амплификаторов группы 1 ¹			Для амплификаторов группы 2 ²		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	42	95	10 с	42
	60	10 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
4	72	1 мин	1	72	1 мин	1
5	10	хранение		10	хранение	

¹ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus (Human enterovirus)</i>

Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов).

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
четыре лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)



А.О.Лисицына
20 23 г.



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



Краткое руководство

набор реагентов **АмплиСенс® Human enterovirus-FL**

Форма 3:

REF H-2773-1-4



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

IVD

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп».

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

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

ВНИМАНИЕ! Для фекалий требуется предварительная обработка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Все образцы	125 мкл*	в каждую пробирку

*Допускается использование Буфера для элюции А, входящего в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

ВНИМАНИЕ! 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.

ОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОТ-ПЦР с помощью «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы РНК (25 мкл).

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

- Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью **Enterovirus-Lyo** для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных проб.

Внести по 25 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы РНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК
К+ <i>Enterovirus</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 с РНК-пробами и контролями. Время внесения проб в реакционную смесь и запуска реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Единая программа амплификации «АмплиСенс»				
Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	45
	60	20 с	FAM, JOE	

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

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Enterovirus</i> (<i>Human enterovirus</i>)

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

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

лист 6

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)



2023 г.

А.О.Лисицына

М.П.

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов АмплиСенс® Human enterovirus-FL

Форма 1	LOT ДД.ММ.ГГ	 ГГГГ-ММ-ДД
		 ГГГГ-ММ-ДД

ТУ 21.20.23-277-01897593-2017.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма		Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Детекция в режиме «реального времени»	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение <i>Ct</i> отсутствует или определено больше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Значение флуоресцентного сигнала выше порогового по каналу для флуорофора FAM. Значение флуоресцентного сигнала ниже порогового по каналу для флуорофора JOE	
Положительный результат для образца К+ (К+ Enterovirus) (положительный контроль ОТ-ПЦР, ПЦР)	Детекция в режиме «реального времени»	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Значение флуоресцентного сигнала выше порогового по каналам для флуорофоров FAM и JOE	
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ОТ-ПЦР, ПЦР)	Детекция в режиме «реального времени»	Значение <i>Ct</i> отсутствует или определено больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Значение флуоресцентного сигнала ниже порогового значения по каналам для флуорофоров FAM и JOE	
Значение фона/нормировки	Детекция по «конечной точке»	Абсолютное значение флуоресцентного сигнала для образцов «ФОН» не выше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Набор реагентов должен выявлять РНК энтеровирусов человека в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл и выше при экстракции РНК с помощью комплекта «РИБО-преп» из разведения стандартного образца предприятия	Детекция в режиме «реального времени»	Определено значение <i>Ct</i> менее граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Определено значение флуоресцентного сигнала выше порогового значения положительного результата по каналу для флуорофора JOE	

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации	
ПЦР-смесь-FL Enterovirus	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1	2
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	соответствует	1	
ПЦР-буфер-А-Фон ¹	Прозрачная жидкость красного цвета	соответствует	1	
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
ТМ-Реввертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
К+ Enterovirus	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	соответствует		2
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2

¹ Реагент используется только в случае амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2 без разуккомплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus*, 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 *Enterovirus* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

ДД.ММ.ГГ

Руководитель ТКК



(подпись)

(Коды О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов АмплиСенс® Human enterovirus-FL

Форма 2	LOT ДД.ММ.ГГ	 ГГГГ-ММ-ДД
		 ГГГГ-ММ-ДД

ТУ 21.20.23-277-01897593-2017.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма		Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Детекция в режиме «реального времени»	Определено значение C_t меньше граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение C_t отсутствует или определено больше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Значение флуоресцентного сигнала выше порогового по каналу для флуорофора FAM. Значение флуоресцентного сигнала ниже порогового по каналу для флуорофора JOE	
Положительный результат для образца К+ (К+ Enterovirus) (положительный контроль ОТ-ПЦР, ПЦР)	Детекция в режиме «реального времени»	Определено значение C_t меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Значение флуоресцентного сигнала выше порогового по каналам для флуорофоров FAM и JOE	
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ОТ-ПЦР, ПЦР)	Детекция в режиме «реального времени»	Значение C_t отсутствует или определено больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Значение флуоресцентного сигнала ниже порогового значения по каналам для флуорофоров FAM и JOE	
Значение фона/нормировки	Детекция по «конечной точке»	Абсолютное значение флуоресцентного сигнала для образцов «ФОН» не выше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Набор реагентов должен выявлять РНК энтеровирусов человека в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл и выше при экстракции РНК с помощью комплекта «РИБО-преп» из разведения стандартного образца предприятия	Детекция в режиме «реального времени»	Определено значение C_t меньше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
	Детекция по «конечной точке»	Определено значение флуоресцентного сигнала выше порогового значения положительного результата по каналу для флуорофора JOE	

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации	
ПЦР-смесь-FL Enterovirus	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1	2
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	соответствует	1	
ПЦР-буфер-А-Фон ¹	Прозрачная жидкость красного цвета	соответствует	1	
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
ТМ-Реввертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2
К+ Enterovirus	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	соответствует		2
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2

¹ Реагент используется только в случае амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения. Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FEP/FRT-50-0,2 без разукomплектовки при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50-0,2 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus*, 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 *Enterovirus* хранить в защищенном от света месте. Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

ДД.ММ.ГГ

Руководитель ГKK



(подпись)

(Коды О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов АмплиСенс® Human enterovirus-FL

Форма 3	LOT ДД.ММ.ГГ	 ГГГГ-ММ-ДД
		 ГГГГ-ММ-ДД

ТУ 21.20.23-277-01897593-2017.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Отрицательный результат для образца ОК (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение C_t меньше граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение C_t отсутствует или определено больше граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Положительный результат для образца К+ (К+ Enterovirus) (положительный контроль ОТ-ПЦР)	Определено значение C_t меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Отрицательный результат для образца К- (отрицательный контроль ОТ-ПЦР)	Значение C_t отсутствует или определено больше граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Набор реагентов должен выявлять РНК энтеровирусов человека в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл и выше при экстракции РНК с помощью комплекта «РИБО-преп» из разведения стандартного образца предприятия	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь Enterovirus-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	3
К+ Enterovirus	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	3
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	3
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	3
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	3
Буфер для элюции А	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	3

3. Условия транспортирования и хранения:

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

Хранение.

Форма 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь Enterovirus-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь Enterovirus-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

ДД.ММ.ГГ

Руководитель ГИК

(подпись)

(Коды О.И.)

(Ф.И.О.)



КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3
трц лист 2

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)



А.О.Лисицына

А.О.Лисицына

2023 г.

М.П.

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® *Human enterovirus-FL*

Форма 1 **REF** H-2771-3-2

Форма 2 **REF** H-2772-3

Форма 3 **REF** H-2773-1-4

LOT ДД.ММ.ГГ

Детекция по «конечной точке»

Настройки теста «*Enterovirus*» для флуоресцентных детекторов

ALA-1/4, «Джин», «Джин-4»

Канал	Назначение	Порог отрицательного результата	Порог положительного результата	Порог
HEX	<i>Enterovirus</i>	2,5	3,0	—
FAM	BKO	—	—	3,0

Детекция в режиме «реального времени»

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	5%

Примечание – В случае, если кривые флуоресценции по каналу JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту (не имеют S-образный вид), допускается увеличение значения порога отрицательных проб (*NTC threshold /Порог Фона – ПФ*) до 10 %.

Настройки для приборов планшетного типа

iCycler iQ5

Канал	Threshold/Порог
FAM, JOE/HEX	Уровень пороговых линий устанавливается вручную в окне анализа результатов на минимальной высоте, обеспечивающей отсутствие пересечения с кривыми флуоресценции отрицательных образцов

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапа циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**

Канал	Threshold/Порог
FAM, HEX	Для каждого канала установить уровень пороговой линии на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов К+ в последнем цикле амплификации

Продолжение см. на обороте

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® *Human enterovirus-FL*

Форма 1 **REF** H-2771-3-2

Форма 2 **REF** H-2772-3

Форма 3 **REF** H-2773-1-4

LOT ДД.ММ.ГГ

Детекция по «конечной точке»

Настройки теста «*Enterovirus*» для флуоресцентных детекторов

ALA-1/4, «Джин», «Джин-4»

Канал	Назначение	Порог отрицательного результата	Порог положительного результата	Порог
HEX	<i>Enterovirus</i>	2,5	3,0	—
FAM	BKO	—	—	3,0

Детекция в режиме «реального времени»

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	10%
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,05	включена	включена	5%

Примечание – В случае, если кривые флуоресценции по каналу JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту (не имеют S-образный вид), допускается увеличение значения порога отрицательных проб (*NTC threshold /Порог Фона – ПФ*) до 10 %.

Настройки для приборов планшетного типа

iCycler iQ5

Канал	Threshold/Порог
FAM, JOE/HEX	Уровень пороговых линий устанавливается вручную в окне анализа результатов на минимальной высоте, обеспечивающей отсутствие пересечения с кривыми флуоресценции отрицательных образцов

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапа циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**

Канал	Threshold/Порог
FAM, HEX	Для каждого канала установить уровень пороговой линии на 10-20 % от максимального уровня флуоресценции образцов К+ в последнем цикле амплификации

Продолжение см. на обороте

«ДТ-96». «ДТпрайм»

Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Treshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/ порог нормализации данных
FAM, Hex/R6G	90 %	10 StD	5 % F(Cp)	30 % F(Cp)

Граничные значения порогового цикла C_t

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
ОК	38	>38 или отсутствует	40	>40 или отсутствует
К–	>38 или отсутствует	>38 или отсутствует	>40 или отсутствует	>40 или отсутствует
К+	38	38	40	40
Исследуемые образцы	38	38	40	40

«ДТ-96». «ДТпрайм»

Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Treshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/ порог нормализации данных
FAM, Hex/R6G	90 %	10 StD	5 % F(Cp)	30 % F(Cp)

Граничные значения порогового цикла C_t

Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
ОК	38	>38 или отсутствует	40	>40 или отсутствует
К-	>38 или отсутствует	>38 или отсутствует	>40 или отсутствует	>40 или отсутствует
К+	38	38	40	40
Исследуемые образцы	38	38	40	40

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

рба лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)



Лисицына

А.О.Лисицына

«21» 03 2023 г.

М.п.