

«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

« 26 » марта 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

для выявления и дифференциации РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2 геногруппы (*Norovirus GII*) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL*»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	17
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	20
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	20
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FER/FRT-50 F	
ДЕТЕКЦИЯ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
СОСТАВ.....	22
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	23
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР.....	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	25
В. Анализ и интерпретация результатов	27
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FER/FRT-50 F ДЕТЕКЦИЯ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	32
СОСТАВ.....	32
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	33
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР	33
Б. Проведение ОТ-ПЦР	36
В. Флуоресцентная детекция продуктов ОТ-ПЦР по «конечной точке».....	37
Г. Интерпретация результатов.....	37
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	42
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	43
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	44

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FER	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL*» предназначен для качественного определения и дифференциации РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2 геногруппы (*Norovirus GII*), астровирусов (*Astrovirus*) в биологическом материале (фекалии) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на острые кишечные инфекции вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в различных популяционных и демографических группах.

Набор реагентов может применяться для исследования объектов окружающей среды (концентратов образцов воды) при

проведении профилактических мероприятий с целью предотвращения заболевания человека.

Потенциальные пользователи медицинского изделия: к работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники (например, врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант), обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

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

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на острые кишечные инфекции вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременном проведении реакций обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых микроорганизмов 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

про
фл
сис
пом
ПЦ
Е
в
2 в
Рез
кан

ОТ No
ОТ Ro
ОТ No
ОТ Ro

ФО
ФО
«
тра
фл
«ре
фо
нес
РН
«
амп
АН
»
ком

продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала либо с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени», либо с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора после окончания ПЦР (детекция по «конечной точке»).

Выявление РНК возбудителей для одного образца проводится в двух пробирках, в одной пробирке дифференцируются 2 возбудителя, в другой – один возбудитель и ВКО-FL. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Наименование ПЦР-смеси-1	Выявляемая кДНК-мишень	
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus</i> / STI	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus</i> / <i>Astrovirus</i>	кДНК <i>Rotavirus</i> A	кДНК <i>Astrovirus</i>
Наименование ПЦР-смеси-1	Область амплификации	
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus</i> / STI	искусственная нуклеотидная последовательность	ген капсидного белка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus</i> / <i>Astrovirus</i>	NSP2	ген капсидного белка

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК 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.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 тестов (110 реакций амплификации), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Характеристики были определены при использовании комплектов для экстракции РНК/ДНК «РИБО-сорб»

(ПУ № ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265).

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Ротавирусы группы А (<i>Rotavirus A</i>)	Фекалии, концентраты образцов воды	1×10^4
Норовирусы 2 геногруппы (<i>Norovirus GII</i>)	Фекалии, концентраты образцов воды	5×10^3
Астровирусы (<i>Astrovirus</i>)	Фекалии, концентраты образцов воды	1×10^4

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 заявленных микроорганизмов.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также геномной ДНК человека:

- РНК вирусов: Quantitative Synthetic RNA from *Astrovirus* ATCC® VR-3238SD™ в концентрации не менее 1×10^4 и не более 1×10^5 ГЭ/мл; *Norovirus GII*, *Rotavirus A*, *Astrovirus* (клинические образцы, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл;
- ДНК/РНК вирусов: Quantitative Synthetic DNA from *Hepatitis A virus* ATCC® VR-3257SD™, Quantitative Synthetic *Norovirus G1 (I)* RNA ATCC® VR-3234SD™, Quantitative Synthetic RNA from *Sapovirus* ATCC® VR-3237SD™, Quantitative Genomic DNA from *Human adenovirus 41* ATCC® VR-930DQ™ в концентрации не менее 1×10^4 и не более 1×10^5 ГЭ/мл; *Human adenovirus F* (клинические образцы, видовая принадлежность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей) в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ/мл;

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^5 и не более 1×10^7 ГЭ/мл:
- Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Aggregatibacter aphrophilus* ATCC® 7901™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617™, *Bordetella pertussis* ATCC® 9340™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Clostridioides difficile* ATCC® 9689™, *Clostridium septicum* ATCC® 12464™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Cutibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*) ATCC® 43055™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Enterococcus faecalis* (vancomycin resistant) ATCC® 51299™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC® 19414™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Escherichia coli* ATCC® 35218™, *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 9006™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211™, *Klebsiella aerogenes* ATCC® 13048™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* (*murrayi*) ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Meyerozyma guilliermondii* ATCC® 6260™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 25238™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 25240™, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC® 8176™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Peptoniphilus* (*Peptostreptococcus*) *anaerobius* ATCC® 27337™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC® 14028™, *Serratia marcescens* ATCC® 14756™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 43300™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC®

33591™, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 12600™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *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 dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC® 12388™, *Streptococcus equi* subsp. *equi* ATCC® 9528™, *Streptococcus gallolyticus* ATCC® 9809™, *Streptococcus mutans* ATCC® 35668™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 27336™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6303™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6305™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius* ATCC® 13419™, *Streptococcus uberis* ATCC® 700407™, *Trichophyton interdigitale* ATCC® 9533™, *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188™, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802™, *Vibrio vulnificus* ATCC® 27562™, *Corynebacterium minutissimum* ATCC® 23348™; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708™, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* ATCC® 12325™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi C* ATCC® 13428™, *Shigella sonnei* ATCC® 25931™, *Campylobacter fetus* ATCC® 27374™, *Campylobacter jejuni* ATCC® 33560™, *Salmonella bongori* ATCC® 43975™, *Salmonella enterica* subsp. *indica* ATCC® 43976™, *Campylobacter coli* ATCC® 49941™, *Salmonella enterica* subsp. *salamae* ATCC® 700148™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi B* ATCC® 8759™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Oranienburg* ATCC® 9239™, *Shigella boydii* ATCC® 9905™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* ATCC® BAA-2162™, *Campylobacter hominis* ATCC® BAA-381™;

- ДНК человека в концентрации 0,2 мг/мл.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартных образцов предприятия, содержащие РНК *Rotavirus A*, *Norovirus GII*, *Astrovirus* в концентрациях, соответствующих пределу обнаружения, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

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

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
<i>Rotavirus A</i>	10	100	40	100
<i>Norovirus GII</i>	10	100	40	100
<i>Astrovirus</i>	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы 200 образцов концентратов воды и 711 образцов фекалий.

В качестве референтного метода использовался набор реагентов АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL (ПУ № РЗН 2021/13776).

Результаты представлены в табл. 4 и 5.

**Результаты тестирования набора
«АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL» в
сравнении с референтным методом**

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL»		Результаты применения референтного метода	
				положительных	отрицательных
Rotavirus A	фекалии	Всего исследовано 711 образцов	положительных	262	2
			отрицательных	3	449
	концентраты образцов воды	Всего исследовано 200 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	100
Norovirus GII	фекалии	Всего исследовано 711 образцов	положительных	185	2
			отрицательных	3	526
	концентраты образцов воды	Всего исследовано 200 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	100
Astrovirus	фекалии	Всего исследовано 711 образцов	положительных	90	1
			отрицательных	3	621
	концентраты образцов воды	Всего исследовано 200 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	100

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL»**

Выявляемый патоген	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Rotavirus A	фекалии	98,87 (97,59-100) %	99,56 (98,94-100) %
	концентраты образцов воды	100 (97,05-100) %	100 (97,05-100) %
Norovirus GII	фекалии	98,4 (96,6-100) %	99,62 (99,1-100) %
	концентраты образцов воды	100 (97,05-100) %	100 (97,05-100) %
Astrovirus	фекалии	96,77 (93,13-100) %	99,84 (99,52-100) %
	концентраты образцов воды	100 (97,05-100) %	100 (97,05-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, 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

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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. Емкость для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, однократного применения, стерильная.

Предварительная подготовка исследуемого материала

2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
3. Глицерин для длительного хранения биологического материала (фекалий) в условиях низкотемпературной заморозки.
4. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
5. Закручивающиеся крышки к пробиркам.
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл.
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 1000 мкл.
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
9. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.
10. Центрифуга-вортекс.
11. Автоматические дозаторы переменного объема.
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

13. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

15. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ПУ № ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» вариант 100-200М или вариант 5000-200М (ПУ № ФСР 2010/07265)
16. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

17. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа» (например, KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (ПУ № ФСЗ 2009/05562))).
18. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265)).
19. Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции в соответствии с рекомендациями производителя.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

20. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.
21. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл или 0,1 мл.
22. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
23. Центрифуга-вортекс.
24. Автоматические дозаторы переменного объема
25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
26. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
27. Емкость для сброса наконечников.

При проведении детекции по «конечной точке»:

28. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки.

объемом 1,5 мл для приготовления реакционной смеси.

б) пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в зависимости от модели используемого амплификатора)

29. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01275)), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), Veriti Thermal Cyclor (Life Technologies Corporation («Лайф Текнолоджис Корпорейшн»), США (РУ № ФСЗ 2011/09244)), MaxyGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк.»), США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).

30. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия), «Джин», «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01274, РУ № ФСР 2007/01249)))

При проведении детекции в режиме «реального времени»:

31. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – 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 – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.

32. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399))).

33. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

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

Образцы фекалий

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

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

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

Допускается хранение образцов фекалий до проведения предобработки:

- при температуре от 18 до 25 °C – не более 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Концентраты образцов воды (для проведения ПЦР-исследования):

Взятие образцов воды производится в соответствии с МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» и МУК 4.2.1018-01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» или актуальными версиями данных документов, действующими на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

Допускается хранение образцов концентратов воды до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Концентраты образцов воды не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий требуют предварительной подготовки.

Приготовление фекальной суспензии:

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

Фекалии водянистой полупрозрачной консистенции используются для экспресс-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 аэрозольным фильтром забрать 1 мл фекальной суспензии, вставить его в подготовленный наконечник с ватным фильтром и под давлением провести фильтрацию в новую одноразовую пробирку. При затрудненной фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию фекальной суспензии.
 4. Аликвоту фильтрата в объеме 100 мкл используют для экстракции нуклеиновых кислот.

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

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются образцы фекалий, взятые непосредственно из судна для дефекации или другой емкости многократного использования (вне зависимости от методов их дезинфекции).

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут

при
исг
{
до
ве
ин
об
при
об

пол
ин

присутствовать в биологическом материале (фекалии), используемом для исследования (см. табл. 6).

Были протестированы модельные образцы фекалий без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Модельные образцы содержали разведения стандартных образцов предприятия в концентрациях, соответствующих пределу обнаружения.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Цельная кровь	до 40 % (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	Фекальные жиры	до 40 % (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
	Муцин (слизь)	до 1 % (объем интерферента к объему исследуемого образца)	Не обнаружено
Экзогенные вещества	«Энтерофурил», суспензия для приема внутрь (Босналек АО, Босния и Герцеговина)	до 4,25 мг/мл	Не обнаружено
	«Энтеросгель», паста для приема внутрь (сладкая) («ТНҚ СИЛМА», Россия)	до 174,75 мг/мл	Не обнаружено
	Декстрин (Россия)	до 68,6 мг/мл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК с гибридационно-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 используются комплекты реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», «МАГНО-сорб». Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁴. Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «МАГНО-сорб».

Экстракцию РНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп»:

Объем ВКО – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

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

Объем элюции – 50 мкл. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! При экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов используется только Буфер для элюции В, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL».

⁴ Станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

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

Объем исследуемого образца: при исследовании фекалий – **100 мкл**, при исследовании концентратов образцов воды – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

Объем элюции – **100 мкл**. Допускается увеличение объема элюции до 200 мкл.

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

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2 геногруппы (*Norovirus GII*) и астровирусов (*Astrovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus / Astrovirus</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus / STI</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК <i>Rotavirus-Flu / Astrovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Norovirus 2</i> генотип-Flu / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

Программное обеспечение AmpliSens® *Rotavirus / Norovirus / Astrovirus* Soft версия 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

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

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

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

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

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

А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционных смесей. На одну реакцию требуется **10 мкл** одной из **ПЦР-смесей-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI или ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*)**, **5 мкл ПЦР-буфера-С**, **0,25 мкл RT-G-mix-2**, **0,5 мкл полимеразы (TaqF)** и **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**. Смеси готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7). Для приготовления реакционных смесей реагенты берутся с запасом на одну реакцию (см. табл. 7). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

2. Разморозить пробирки с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI** и **ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus***. Перемешать содержимое всех пробирок ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

3. В двух отдельных пробирках приготовить две реакционные смеси:

- в первой пробирке, промаркированной «**Noro/STI**», смешать необходимое количество **ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI**, **ПЦР-буфера-С**, **полимеразы (TaqF)**, **RT-G-mix-2** и **ТМ-Ревертазы (MMIv)**, осадить капли на вортексе;
- во второй пробирке, промаркированной «**Rota/Astro**», смешать необходимое количество **ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus***, **ПЦР-буфера-С**, **полимеразы (TaqF)**, **RT-G-mix-2** и **ТМ-Ревертазы (MMIv)**, осадить капли на вортексе.

Таблица 7

Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

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

4. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных проб. Промаркировать пробирки «**Noro/STI**», «**Rota/Astro**».
5. Внести в каждую пробирку первого ряда по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси «**Noro/STI**», в каждую пробирку второго ряда – по **15 мкл** приготовленной

⁵ Число исследуемых образцов + контроль этапа экстракции РНК + 2 контроля этапа ОТ-ПЦР + запас на один образец (N+1+2+1, где N-количество исследуемых образцов).

реакционной смеси **«Rota/Astro»**. Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.

6. В каждые две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплекта реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в две пробирки с различными реакционными смесями **«Noro/STI»**, **«Rota/Astro»** внести по **10 мкл К–**.
- б) **положительный контроль ПЦР (К+_{Noro/STI})** – в пробирку с реакционной смесью **«Noro/STI»** внести **10 мкл ПКО кДНК Norovirus 2** генотип-Flu / STI.
- в) **положительный контроль ПЦР (К+_{Rota/Astro})** – в пробирку с реакционной смесью **«Rota/Astro»** внести **10 мкл ПКО кДНК Rotavirus-Flu / Astrovirus**.
- г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в две пробирки с различными реакционными смесями **«Noro/STI»**, **«Rota/Astro»** внести по **10 мкл пробы**, экстрагированной из **ОКО**.

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Рекомендуется:

- а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
- б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

2. Запустить программу амплификации:

- а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft.

Примечание – Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS).

- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий

амплификатор для выполнения программы⁶, указанной в табл. 8 или 9, согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! При одновременной загрузке в прибор роторного типа пробирок с разными реакционными смесями необходимы дополнительные настройки оптимизации уровня флуоресцентного сигнала (см. вкладыш к набору реагентов).

Таблица 8

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

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁷ и планшетного⁸ типа

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

⁶ Программы амплификации (табл. 8, 9) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁷ Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁸ Например, ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

ВНИМАНИЕ! Данная программа (см. табл. 9) может применяться для всего комплекса наборов реагентов «АмплиСенс», предназначенных для выявления и дифференциации ДНК/РНК микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции, с возможностью их совместного использования при одном запуске прибора. При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят вручную с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft. Порядок работы с ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft описан в руководстве оператора.

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

Таблица 10

Наименование ПЦР-смеси-1	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus</i> / STI	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus</i> / <i>Astrovirus</i>	кДНК <i>Rotavirus</i> A	кДНК <i>Astrovirus</i>

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла (C_t). При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft значения C_t определяются автоматически.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 11 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 1

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Реакционная смесь	Контроль	Контролируемый этап	Значение Ct по каналу для флуорофора	
			FAM	JOE
«Noro/STI»	OK	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного
	K+ <i>Noro/STI</i>	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	K-	ОТ-ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
«Rota/Astro»	OK	Экстракция РНК	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
	K+ <i>Rota/Astro</i>	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	K-	ОТ-ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного

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

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 12:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение Ct по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
Реакционная смесь «Noro/STI»		
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Norovirus</i> GII обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного или отсутствует или больше граничного*	отсутствует или больше граничного	РНК <i>Norovirus</i> GII НЕ обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	Невалидный**
Реакционная смесь «Rota/Astro»		
<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	РНК <i>Rotavirus</i> A обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>Astrovirus</i> обнаружена
отсутствует или больше граничного*	отсутствует или больше граничного*	РНК <i>Rotavirus</i> A и РНК <i>Astrovirus</i> НЕ обнаружены

* Результат интерпретируется как «РНК возбудителя не обнаружена», если:

- значение Ct по каналу для флуорофора FAM на

реакционной смеси «Noro/STI» меньше граничного;

- значение C_t по каналу для флуорофора FAM на реакционной смеси «Noro/STI» отсутствует или больше граничного, при этом значение C_t определено меньше граничного хотя бы по одному из других каналов (по каналу для флуорофора JOE на реакционной смеси «Noro/STI», по каналам для флуорофоров FAM и JOE на реакционной смеси «Rota/Astro».

**** Если значение C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE на реакционной смеси «Noro/STI» отсутствует или больше граничного, а также отсутствует или больше граничного C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE на реакционной смеси «Rota/Astro», то результат анализа для данного образца считается невалидным. 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 прилагавом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+):

- а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE при использовании реакционной смеси «Rota/Astro» и по каналу для флуорофора JOE при использовании смеси «Noro/STI» значение порогового цикла (C_t) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых РНК анализируемой мишени не обнаружена. Необходимо повторить амплификацию таких образцов, а для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма, необходимо исключить ситуацию, описанную в п. 4.
- б) по каналу для флуорофора FAM при использовании реакционной смеси «Noro/STI» значение порогового цикла (C_t) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена РНК всех анализируемых мишеней (значение порогового цикла (C_t) по каналам для

флуорофоров FAM и JOE при использовании реакционной смеси «Rota/Astro» и по каналу для флуорофора JOE при использовании смеси «Noro/STI» отсутствует или превышает граничное значение). Необходимо повторить амплификацию для таких образцов, а для образцов, в которых значение C_t по каналу для флуорофора FAM меньше граничного при использовании реакционной смеси «Noro/STI», необходимо исключить ситуацию, описанную в п. 4.

2. Для отрицательного контроля экстракции (OK):

а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE при использовании реакционной смеси «Rota/Astro» и по каналу для флуорофора JOE при использовании реакционной смеси «Noro/STI» определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

б) по каналу для флуорофора FAM при использовании реакционной смеси «Noro/STI» значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 12.

3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (K-):

а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE при использовании реакционной смеси «Rota/Astro» и по каналу для флуорофора JOE при использовании реакционной смеси «Noro/STI» определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного, при этом на графике флуоресценции присутствует участок характерного экспоненциального подъема. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов /

4.

исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.

б) по каналу для флуорофора FAM при использовании реакционной смеси «Noro/STI» определено значение порогового цикла (C_t) меньше граничного, при этом на графике флуоресценции присутствует участок характерного экспоненциального подъема. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружены РНК анализируемых мишеней. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.

в) определено значение порогового цикла, но график флуоресценции по этому каналу не имеет правильной формы с участком характерного экспоненциального подъема флуоресценции (в частности, если график представляет собой прямую линию), результат является ошибочным, его интерпретировать как отрицательный.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии или при анализе результатов в автоматическом режиме, то требуется повторно провести амплификацию для этого образца.

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2 геногруппы (*Norovirus GII*) и астровирусов (*Astrovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus / Astrovirus</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus / STI</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК <i>Rotavirus-Flu / Astrovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Norovirus 2</i> генотип-Flu / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

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

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

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

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 двух реакционных смесей. На одну реакцию требуется 10 мкл одной из ПЦР-смесей-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1-FER/FRT *Norovirus* / STI или ОТ-ПЦР-смесь-1-FER/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*), 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,25 мкл RT-G-mix-2, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,25 мкл ТМ-Реввертазы (MMIv). Смеси готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7), а также двух образцов «Фон» для каждого типа смеси. Для приготовления реакционных смесей реагенты берутся с запасом на одну реакцию (см. табл. 13). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

2. Разморозить пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-1-FER/FRT *Norovirus* / STI и ОТ-ПЦР-смесью-1-FER/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*. Перемешать содержимое всех пробирок ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок для ОТ-ПЦР с учетом количества исследуемых, контрольных образцов и двух образцов «Фон».

4. В двух отдельных пробирках подготовить две реакционные смеси:

- в первой пробирке, промаркированной «**Noro/STI**», смешать необходимое количество **ОТ-ПЦР-смеси-1-FER/FRT *Norovirus* / STI**, **ПЦР-буфера-С**, **RT-G-mix-2**, осадить капли на вортексе.
- во второй пробирке, промаркированной «**Rota/Astro**» смешать необходимое количество **ОТ-ПЦР-смеси-1-FER/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus***, **ПЦР-буфера-С**, **RT-G-mix-2**, осадить капли на вортексе.

Добавить в две пробирки «Фон» (для каждой реакционной смеси) 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 оставшиеся части реакционных смесей добавить необходимое количество **полимеразы (TaqF)** и **ТМ-Ревертазы (MMIv)** согласно расчетной таблице, приведенной в табл. 13. Перемешать и осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv), указанное в табл. 13, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

Таблица 13

**Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР
с детекцией по «конечной точке»**

		Объем реагентов на указанное количество реакций				
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число исследуемых образцов	Число реакций ⁹	ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-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

5. Внести в каждую пробирку первого ряда для исследуемых и контрольных образцов по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси **«Noro/STI»**, в каждую пробирку второго ряда – по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси **«Rota/Astro»**. Сверху добавить по **1 капле минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.

6. В каждые две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплекта реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в две пробирки с различными реакционными смесями **«Noro/STI»**,

⁹ Число исследуемых образцов + контроль этапа экстракции РНК + 2 контроля этапа ОТ-ПЦР + 2 пробирки «Фон» + запас на один образец (N+1+2+2+1, где N-количество исследуемых образцов).

«Rota/Astro» внести по 10 мкл К–.

- б) **положительный контроль ПЦР (К⁺_{Noro/STI})** – в пробирку с реакционной смесью «Noro/STI» внести 10 мкл ПКО кДНК *Norovirus 2* генотип-Flu/STI.
- в) **положительный контроль ПЦР (К⁺_{Rota/Astro})** – в пробирку с реакционной смесью «Rota/Astro» внести 10 мкл ПКО кДНК *Rotavirus-Flu/Astrovirus*.
- г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в две пробирки с различными реакционными смесями «Noro/STI», «Rota/Astro» внести по 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси с РНК-пробами и контролями.

Б. Проведение ОТ-ПЦР

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 14).
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 14

Программа амплификации

Для амплификаторов группы 1 ¹⁰				Для амплификаторов группы 2 ¹¹		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	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.

¹⁰ Например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

¹¹ Например, Gradient Palm Cyclер (Corbett Research), Veriti Thermal Cyclер (Life Technologies Corporation), MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

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 15

Наименование ПЦР-смеси-1	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus / STI</i>	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus / Astrovirus</i>	кДНК <i>Rotavirus</i> A	кДНК <i>Astrovirus</i>

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

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

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 16 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 16

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

Реакцион- ная смесь	Контроль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора	
			FAM	JOE
«Noro/STI»	OK	Экстракция РНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K-	ОТ-ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K+ <i>Noro/STI</i>	ОТ-ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата
«Rota/Astro»	OK	Экстракция РНК	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K-	ОТ-ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
	K+ <i>Rota/Astro</i>	ОТ-ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

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

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 17:

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
Реакционная смесь «Noro/STI»		
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	РНК <i>Norovirus GII</i> НЕ обнаружена
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	РНК <i>Norovirus GII</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Невалидный*
Реакционная смесь «Rota/Astro»		
<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	РНК <i>Rotavirus A</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	РНК <i>Astrovirus</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	РНК <i>Rotavirus A</i> и РНК <i>Astrovirus</i> НЕ обнаружены*
<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	РНК <i>Rotavirus A</i> и РНК <i>Astrovirus</i> обнаружены

* Если флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора **FAM** на реакционной смеси «Noro/STI» ниже порогового значения, то отрицательный результат анализа для всех анализируемых мишеней на реакционной смеси «Rota/Astro» считается невалидным. В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Если значение флуоресцентного сигнала для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, результат расценивается как **сомнительный**. 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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) сигнал по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16) ниже порогового значения положительного результата. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо повторить амплификацию и детекцию таких образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) сигнал по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE при использовании реакционной смеси «Rota/Astro» и по каналу для флуорофора JOE при использовании реакционной смеси «Noro/STI» выше порогового значения отрицательного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
 - б) сигнал по каналу для флуорофора FAM при использовании реакционной смеси «Noro/STI» ниже порогового значения. Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 17.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-):
 - а) сигнал по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE при использовании реакционной смеси «Rota/Astro» и по каналу для флуорофора JOE при использовании реакционной смеси «Noro/STI» выше порогового значения отрицательного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемой мишени. Необходимо предпринять меры по выявлению и

ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

- б) сигнал по каналу для флуорофора FAM при использовании реакционной смеси «Noro/STI» выше порогового значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружены РНК анализируемых мишеней. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

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 °C не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (ПКО кДНК *Rotavirus*-Flu / *Astrovirus*, ПКО кДНК *Norovirus* 2 генотип-Flu / STI, К-, минеральное масло для ПЦР, ВКО-FL, ОКО, буфер для элюции В) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °C;
- часть 2 (ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*, ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF), ТМ-ревертаза (MMIv), RT-G-mix-2) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °C. ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*, ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI хранить в защищенном от света месте

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхняя граница температурного диапазона



Дата изготовления



Изготовитель

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 23

двадцать три лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

« 26 » 03 2024 г.

М.П.

А.О.Лисицына

Всего пронумеровано
прошнуровано и скреплено
печатью 23 листа(в)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.



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



Краткое руководство

набор реагентов «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL»

Форма 1: **REF** V40(RG,iQ,FEP), **REF** H-0551-3



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-сорб»,
- «РИБО-преп»,

«МАГНО-сорб» (с использованием магнитных штативов вручную или автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот¹).

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

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

ВНИМАНИЕ! Для фекалий требуется предварительная подготовка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-сорб», «РИБО-преп» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
фекалии, концентраты образцов воды	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК

Элюция

Все образцы	50 мкл, допускается увеличение до 100 мкл	в каждую пробирку ВНИМАНИЕ! Используется только Буфер для элюции В , входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL»
-------------	--	---

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:			Цикл	Е
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку	1	
фекалии	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов	2	
концентраты образцов воды	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов	3	
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОК		
Элюция				
Все образцы	100 мкл, допускается увеличение до 200 мкл	в каждую пробирку		

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

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ 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).
 Каждый исследуемый образец исследуется в 2 реакционных смесях.
- Контроли:** для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроль ОТ-ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК) для каждой реакционной смеси.
- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционных смесей.
 - Разморозить пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI, ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Rotavirus* *Astrovirus*.
 - В двух отдельных пробирках подготовить реакционные смеси «Noro/STI», «Rota/Astro»:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus</i> / STI или ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus</i> / <i>Astrovirus</i>	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	
ТМ-Реввертаза (MMIv)	0,25*(N+K+1)	
RT-G-mix-2	0,25*(N+K+1)	

- ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.
- Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для обратной транскрипции амплификации исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов, ОКО	в две пробирки с различными реакционными смесями «Noro/STI», «Rota/Astro» для исследуемых образцов, ОК . <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
ПКО кДНК <i>Norovirus</i> 2 генотип-Flu/STI	в пробирку для K+<i>Noro/STI</i> с реакционной смесью «Noro/STI»
ПКО кДНК <i>Rotavirus</i> -Flu/ <i>Astrovirus</i>	в пробирку для K+<i>Rota/Astro</i> с реакционной смесью «Rota/Astro»
K-	в две пробирки с различными реакционными смесями «Rota/Astro», «Noro/STI» для K-

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

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
- Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Rotavirus* *Norovirus* / *Astrovirus* Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS).
 - б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

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

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс» ²				Программа амплификации			
	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	15 мин	-	1	50	30 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1	95	15 мин	-	1
3	95	10 с	-	45	95	10 с	-	45
	60	20 с	FAM, JOE		60	25 с	FAM, JOE	
					72	10 с	-	

и хранение ВНИМАНИЕ! При одновременной загрузке в прибор роторного типа пробирок с разными реакционными смесями с не более 3-х образцов необходимы дополнительные настройки по оптимизации уровня флуоресцентного сигнала.

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

Анализ результатов проводить вручную с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам и ПЦР-смесям:

Наименование ПЦР-смеси-1	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Norovirus / STI	кДНК ВКО-FL	кДНК Norovirus GII
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Rotavirus / Astrovirus	кДНК Rotavirus A	кДНК Astrovirus

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

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ 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). Каждый исследуемый образец исследуется в 2 реакционных смесях.

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ОТ-ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК) для каждой реакционной смеси.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционных смесей.
- Разморозить пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT Norovirus / STI, ОТ-ПЦР-смесью-1-FEP/FRT Rotavirus / Astrovirus.

м ОТ-ПЦР. В двух отдельных пробирках подготовить реакционные смеси «Noro/STI», «Rota/Astro»:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Norovirus / STI или ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Rotavirus / Astrovirus	10*(N+K+F+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; F – количество образцов «Фон»; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	5*(N+K+F+1)	
RT-G-mix-2	0,25*(N+K+F+1)	

STI», ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

- Добавить в две пробирки «Фон» (для каждого наименования ПЦР-смеси-1) 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 оставшиеся части реакционных смесей добавить:

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

- Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для обратной транскрипции и амплификации исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл	
Приготовленных реакционных смесей	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, ОК	в две пробирки с различными реакционными смесями «Rota/Astro», «Noro/STI» для исследуемых образцов, ОК. При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!
ПКО кДНК Norovirus 2 генотип-Flu/STI	в пробирку для K+Noro/STI с реакционной смесью «Noro/STI»
ПКО кДНК Rotavirus-Flu/Astrovirus	в пробирку для K+Rota/Astro с реакционной смесью «Rota/Astro»

К–

в две пробирки с различными реакционными смесями «Rota/Astro», «Noro/STI» для К–

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И 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 ³			Для амплификаторов группы 2 ⁴		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	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	

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 следующим каналам и ПЦР-смесям:

Наименование ПЦР-смеси-1	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Norovirus</i> / STI	кДНК ВКО-FL	кДНК <i>Norovirus</i> GII
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Rotavirus</i> / <i>Astrovirus</i>	кДНК <i>Rotavirus</i> A	кДНК <i>Astrovirus</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).

³ «Терцию».

ta/Astro»,

на вортесе.
но установит

2⁴

п-во циклов

1

1

42

1

е

используемом
смесям:

Е

ovirus GII

trovirus

прибора.

ть внесены

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3

три лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

«01» 04 2024 г. А.О.Лисицына
м.п.



«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

« 10 » июля 2023 г.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения

AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft

АмплиСенс®



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП РАБОТЫ	4
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ	5
Требования к техническим средствам оператора	5
Требования к входным данным	5
Требования к информационной безопасности	5
ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ	5
Загрузка ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft в ПО ARTS	5
Формирование и запуск постановки	6
Анализ и интерпретация результатов	7
Авторизация результатов ПЦР-исследования	9
Формирование бланка с результатами	9
СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ	10
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ	11

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
Детектирующий амплификатор	- прибор для проведения амплификации с детекцией в режиме «реального времени»
ПО	- программное обеспечение, программа
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
K-	- отрицательный контроль амплификации
K+	- положительный контроль амплификации
Rotavirus A	- род ротавирусов группы А
Norovirus GII	- род норовирусов 2 геногруппы
Astrovirus	- род астровирусов

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Наименование ПО: AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft.

Версия ПО: 1 (номера минорных и незначимых изменений не указаны).

Способ размещения и доступа ПО: входит в состав набора реагентов «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL». ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft и руководство оператора предоставляются на электронном носителе или на официальном сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Класс безопасности: Класс А в соответствии с п. 4.3 ГОСТ IEC 62304.

Порядок нумерации версий ПО: Обозначение версии состоит из трех чисел, разделенных точками, означающих нумерацию мажорных, минорных и незначимых изменений соответственно. Мажорные изменения означают изменение функционального назначения, принципа работы, структуры и функций составных частей ПО; минорные изменения означают изменения названий и обозначений в информационном блоке ПО; незначимые изменения означают изменения (включая исправление ошибок) и доработки, не изменяющие функции, описанные для мажорных и минорных изменений.

Примечание – При обозначении версии ПО в составе набора реагентов «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL» номера минорных и незначимых изменений не указываются. Полная версия ПО, включая номера минорных и незначимых изменений, указана во вкладыше к набору реагентов и в интерфейсе ПО.

ПО соответствует требованиям ГОСТ IEC 62304.

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft

предназначено для автоматического программирования детектирующего амплификатора, совместимого с ПО AmpliSens® RealTime Soft (далее – ПО ARTS), и автоматической обработки и интерпретации результатов ПЦР-исследования при использовании набора реагентов «АмплиСенс® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus-FL» (далее – набор реагентов). ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft представляет собой программу, содержащую критерии анализа кривых флуоресценции и алгоритм интерпретации результатов, а также информацию об аналитах, используемом биологическом материале, реагентах и контрольных образцах, программе амплификации, указанных в инструкции к набору реагентов.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Для работы ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft необходимо ПО ARTS.

В соответствии с информацией об используемом биологическом материале, реагентах, контрольных образцах и программе амплификации, указанной в ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft, ПО ARTS осуществляет запуск детектирующих амплификаторов. После завершения амплификации ПО ARTS визуализирует полученные флуоресцентные кривые и осуществляет автоматический экспорт полученных данных для контрольных и исследуемых образцов в ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft.

ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft проводит автоматическую интерпретацию результатов с использованием полученных значений пороговых циклов (Ct), включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом. Полученные в ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft результаты автоматически передаются в ПО ARTS для их визуализации оператору.

Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора без использования ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft и ПО ARTS. В этом случае файл с данными, полученный на детектирующем амплификаторе, можно экспортировать в ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft для дальнейшей автоматической интерпретации результатов.

Технологии искусственного интеллекта в ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft не используются.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

Требования к техническим средствам оператора

Персональный компьютер с предустановленным ПО ARTS. Системные требования к персональному компьютеру указаны в руководстве оператора ПО ARTS.

Для установки ПО ARTS необходимо обратиться в техническую поддержку для загрузки и запуска установочных файлов ПО ARTS.

Требования к входным данным

Обозначения ячеек исследуемых и контрольных образцов в интерфейсе ПО ARTS должны строго соответствовать их фактическому расположению в реакционном блоке детектирующего амплификатора.

Требования к информационной безопасности

Влияние угроз и уязвимостей ПО на пользователей или пациентов отсутствует.

ПО не содержит и не обрабатывает персональные данные пациентов.

Доступ к ПО осуществляется с помощью авторизации пользователя в ПО ARTS (учетная запись). Уровень доступа пользователей должен быть обеспечен исходя из требуемой функциональности.

В рамках инфраструктуры информационных технологий, использующей ПО, необходимо:

- предпринять меры обеспечения информационной безопасности и кибербезопасности для непрерывного функционирования программного обеспечения и исключения возможности несанкционированного доступа к информации в программном обеспечении;
- обеспечить наличие регулярных архивных копий ПО с возможностью их восстановления;
- использовать средства защиты от вредоносных программ;
- соблюдать требования к информационной безопасности, указанные в руководстве оператора ПО ARTS.

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Загрузка ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft в ПО ARTS

Загрузка ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft в ПО ARTS при наличии подключения персонального компьютера к сети Интернет производится автоматически при запуске ПО ARTS.

При отсутствии подключения персонального компьютера к сети Интернет загрузка в ПО ARTS производится вручную с электронного носителя путем выбора файла с

пакетом ПО, включающим ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft. Для этого в меню **Постановки** выбрать **Пакеты ПО – Загрузить пакет**.

После завершения загрузки установленное ПО отображается в списке **Пакеты ПО** и доступно для формирования и расчета постановок.

Версия ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft отображается в меню **Каталог методик** в столбце **Версия**, а также в меню **Постановки - Пакеты ПО**, после выбора пакета (версия ПО отображается с указанием номеров минорных и незначимых изменений).

Формирование и запуск постановки

Формирование постановки производится с использованием интерфейса ПО ARTS. В соответствии с руководством оператора к ПО ARTS необходимо выполнить следующие действия:

1. Открыть ПО ARTS.
2. Зарегистрировать серию набора реагентов и ввести переменную информацию (при наличии), используя информацию из вкладыша к данной серии набора реагентов.
3. При необходимости сформировать список образцов для исследования с применением набора реагентов (вручную или загрузить из лабораторных информационных систем).
4. Выбрать детектирующий амплификатор и необходимый реакционный блок.
5. Сформировать постановку. Для этого во вкладке, соответствующей выбранному прибору, выбрать **Постановка - Новая постановка**:
 - 5.1. Выбрать из списка доступных программных обеспечений ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft и серию набора реагентов.
 - 5.2. На схематическом изображении реакционного блока детектирующего амплификатора в используемых ячейках разместить образцы из списка, сформированного в п.3 (или ввести их обозначения вручную), и контрольные образцы.
 - 5.3. Сохранить постановку нажатием кнопки **Сохранить**.
6. Для автоматического запуска амплификации нажать кнопку **Старт**. Ход амплификации отобразится в виде кривых накопления флуоресценции.

Примечание – Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора вручную в соответствии с программой амплификации, указанной в инструкции к набору реагентов.

Анализ и интерпретация результатов

После завершения амплификации ПО ARTS автоматически визуализирует кривые флуоресценции.

Примечание – Если детектирующий амплификатор был запрограммирован и запущен вручную, необходимо сформировать постановку, как описано в разделе «Формирование и запуск постановки», нажать кнопку **Выбрать файл** для указания пути к файлу с детектирующего амплификатора и нажать **Рассчитать**.

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции в ПО ARTS указано в таблице 1.

Таблица 1

Флуорофор	FAM	JOE
Название канала детекции в ПО ARTS	FAM	HEX

В соответствии с критериями анализа кривых флуоресценции, указанными в ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft, автоматически определяется статус каждой кривой по каждому каналу детекции: положительный, отрицательный или сомнительный.

Статус присваивается на основании критериев, оценивающих отклонения формы кривой накопления флуоресценции от нормальной (S-образной) формы кривой накопления флуоресценции, например:

- наличие неспецифических скачков флуоресцентного сигнала;
- низкое соотношение сигнал/шум;
- кинетика накопления флуоресцентного сигнала, отличная от S-образной.

Сомнительные кривые классифицируются на «Сомнительно +» и «Сомнительно –», что следует интерпретировать как:

«Сомнительно +» – наиболее вероятно, что для кривой получен положительный результат, требуется подтверждение.

«Сомнительно –» – наиболее вероятно, что для кривой получен отрицательный результат, требуется подтверждение.

Каждой сомнительной кривой необходимо присвоить статус: «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца. Для этого:

1. Отобразить кривые по всем каналам детекции в режиме отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW»).

ВНИМАНИЕ! Не следует принимать решение о статусе сомнительной кривой на основании просмотра нормализованных кривых (режим «Norma»), т.к. в данном

режиме отображаются флуоресцентные кривые после математической обработки.

2. Отфильтровать кривые со статусом «Сомнительный» по каждому каналу. В скобках рядом с названием канала указано количество сомнительных кривых.
3. В списке образцов последовательно присвоить кривым статус «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца («Перестановка» – образцы будут возвращены в список образцов для возможности повторного исследования).

ВНИМАНИЕ! Присвоение статуса сомнительным кривым производится на основании экспертного мнения сотрудника лаборатории, осуществляющего анализ результатов. В случае если для сомнительной флуоресцентной кривой не удастся принять однозначного решения по ее статусу, рекомендуется провести повторное исследование для данного образца.

После просмотра кривых флуоресценции и присвоения статуса всем сомнительным флуоресцентным кривым необходимо нажать кнопку **Результат** для интерпретации результатов.

Во вкладке **AmpliSens Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft** будут выведены результаты, автоматически полученные ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft на основании значений порогового цикла (Ct) для исследуемых образцов, включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом.

Результаты для контрольных образцов выводятся в виде таблицы с детализацией по каналам детекции. Если для одного или нескольких контрольных образцов получено сообщение об ошибке, данный результат дублируется в строке статуса постановки.

Результаты для исследуемых образцов выводятся в качественном формате в виде таблицы с учетом статуса контролей и указанием канала детекции.

Возможные варианты интерпретации результатов исследуемых образцов указаны в таблице 2.

Таблица 2

Качественное определение
Обнаружено
Не обнаружено
Невалидный

Возможные варианты результатов для контролей и интерпретации результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контролей указаны в таблице 3.

Фс
ВН
пол

Статус контроля	Интерпретация результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контроля
	В соответствии с таблицей 2
Контаминация ОКО	Интерпретация невозможна для образцов, в которых обнаружен аналит, определяемый по данному каналу по данной смеси
Ошибка ОКО	В соответствии с таблицей 2
Ошибка К+	Интерпретация невозможна для образцов, в которых не обнаружен аналит, определяемый по данному каналу по данной смеси
Ошибка К+ (по каналу ВКО)	Интерпретация невозможна для образцов, в которых не обнаружены определяемые аналиты по всем смесям
Контаминация К–	Интерпретация невозможна для образцов, в которых обнаружен аналит, определяемый по данному каналу по данной смеси
Контаминация К– (по каналу ВКО)	Интерпретация невозможна для образцов, в которых не обнаружены определяемые аналиты по всем смесям

В случаях, перечисленных в таблице 3, для соответствующих исследуемых образцов в таблице результатов выводится сообщение «Интерпретация невозможна» с указанием причины (например, «Интерпретация невозможна (Ошибка К+)»).

Авторизация результатов ПЦР-исследования

После вывода результатов для исследуемых образцов во вкладке **AmpliSens Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft** необходимо авторизовать (подтвердить) или отвергнуть (отклонить) результаты автоматической интерпретации. Возможны следующие действия в соответствии с руководством оператора к ПО ARTS:

1. Отправка образца на повторное ПЦР-исследование.
2. Отмена результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
3. Авторизация результата ПЦР-исследования каждого образца.
4. Авторизация результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
5. Выгрузка результатов ПЦР-исследования в виде файла в формате CSV (в формате электронной таблицы).
6. Выгрузка постановки в отдельный файл для просмотра в ПО ARTS.
7. Заккрытие вкладки с результатами ПЦР-исследования. Вкладка **AmpliSens Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft** будет закрыта, результаты ПЦР-исследования будут сохранены. Для возвращения к результатам ПЦР-исследования необходимо во вкладке **Список постановок** выбрать из списка необходимую постановку и открыть ее двойным щелчком левой кнопки мыши.

Формирование бланка с результатами

ВНИМАНИЕ! Только авторизованные результаты ПЦР-исследования, полученные с помощью ПО **AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft**, передаются в ПО ARTS

для формирования бланков с результатами для исследуемых образцов и/или передачи в лабораторную информационную систему.

Формирование бланков с результатами производится оператором в ПО ARTS. Поиск, просмотр и печать бланков осуществляется через интерфейс ПО ARTS в соответствии с руководством оператора ПО ARTS.

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

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Для AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft не размещен контроль K+	В реакционном блоке не размещен K+	Указать положение K+ в реакционном блоке, используя кнопку K+
Для AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft не размещен контроль ОК	В реакционном блоке не размещен ОК	Указать положение ОК в реакционном блоке, используя кнопку ОК
Для AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft не размещен контроль K–	В реакционном блоке не размещен K–	Указать положение K– в реакционном блоке, используя кнопку K–
Ошибка K+	Значение Ct для K+ отсутствует или превышает граничное по каналам для флуорофоров JOE (для всех смесей) и/или FAM для реакционной смеси «Rota/Astro»	Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых РНК анализируемой мишени не обнаружена. Необходимо повторить амплификацию таких образцов. Рекомендуется просмотреть положительные кривые флуоресценции в режиме отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW») на наличие участка характерного экспоненциального подъема. Если для исследуемого образца определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема, требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца
Ошибка K+ (по каналу ВКО)	Значение Ct для K+ отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM для реакционной смеси «Noro/STI»	Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых РНК анализируемых мишеней не обнаружены. Необходимо повторить амплификацию таких образцов. Рекомендуется просмотреть положительные кривые флуоресценции в режиме

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
		отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW») на наличие участка характерного экспоненциального подъема. Если для исследуемого образца определено значение C_t , при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема, требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца
Контаминация ОКО	Определено значение C_t для ОК меньше граничного по каналам для флуорофоров JOE (для всех смесей) и/или FAM для реакционной смеси «Rota/Astro»	Повторить ПЦР-исследование для образцов, в которых обнаружена РНК исследуемой мишени, начиная с этапа экстракции РНК
Контаминация К–	Определено значение C_t для К– меньше граничного по каналам для флуорофоров JOE (для всех смесей) и/или FAM для реакционной смеси «Rota/Astro»	Повторить амплификацию для образцов, в которых обнаружена РНК исследуемой мишени, определяемой по данному каналу по данной смеси
Контаминация К– (по каналу ВКО)	Определено значение C_t для К– меньше граничного по каналу для флуорофора FAM для реакционной смеси «Noro/STI»	Повторить амплификацию для образцов, в которых не обнаружены РНК исследуемых мишеней
Ошибка ОКО	Значение C_t для ОК отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM для реакционной смеси «Noro/STI»	Интерпретация результатов для исследуемых образцов проводится согласно таблице 2
Невалидный	Для данного образца значение C_t по каналам для флуорофоров FAM, JOE для всех смесей отсутствует или превышает граничное	Провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ

При выявлении сбоев в работе ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft рекомендуется обращаться в техническую поддержку. При обращении в техническую поддержку необходимо предоставить следующую информацию:

- Номер версии ПО AmpliSens® Rotavirus / Norovirus / Astrovirus Soft и ПО ARTS.
- Описание ошибки (текст или изображение).

- Описание действия / последовательности действий, при которых возникла ошибка.
- Контакты для обратной связи.

Сотрудники технической поддержки могут запросить дополнительную информацию для решения вопроса.

Телефон: +7 (495) 304 22 06 в рабочие часы организации.

Почта: lab@amplisens.ru в режиме 24x7.

Разработчик ПО: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Руководство оператора и интерфейс программного обеспечения разработаны на русском языке и могут быть переведены на другие языки без внесения изменений в программный код ПО.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 7
с.м.б лист 08

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

« 01 » 04 2024 г. А.О.Лисицына

м.п.

