

УТВЕРЖДАЮ

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

В.И.Покровский

«18» апреля 2014 г.



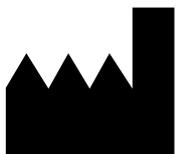
ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Enterovirus-FL*»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
Аналитическая специфичность	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	13
ФОРМАТ FEP	14
СОСТАВ	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ	15
А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР.....	15
Б. Проведение ОТ-ПЦР.....	18
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	18
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	19
ФОРМАТ FRT	21
СОСТАВ	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	22
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР.....	22
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени.....	25
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	28
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87-rec	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты микроорганизма
К+	- положительный контроль этапа ПЦР
К-	- отрицательный контроль этапа ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, полученная в ходе реакции обратной транскрипции
ОК	- отрицательный контроль этапа экстракции
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
EV	- <i>Enterovirus</i>
EV71	- <i>Enterovirus 71</i> типа

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» предназначен для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) в биологическом материале (у лиц с подозрением на энтеровирусную инфекцию вне зависимости от формы и наличия ее манифестации) и объектах окружающей среды методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов предназначен для качественного определения и используется для клинической лабораторной диагностики.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат образцы РНК, экстрагированные из различных типов биологического материала (спинномозговая жидкость, образцы фекалий) и образцов объектов окружающей среды (концентраты образцов воды) в соответствии с МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции».

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹⁾.

¹⁾ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию РНК из исследуемых образцов, объединенный этап обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция РНК из биологического материала и концентратов воды проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы РНК используются для проведения реакции обратной транскрипции и амплификации участка кДНК (*Human enterovirus*) при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Таq-полимеразы. Химически модифицированная полимераза (ТаqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для обратной транскрипции, амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность ²⁾ , ГЭ/мл
Спинномозговая жидкость (СМЖ), концентраты образцов воды	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	5x10 ³
Фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ⁴

²⁾ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов: энтеровирусов человека (представителей разных генетических кластеров – *Human echovirus* 2, 6, 9, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 30; *Human coxsackievirus* A4, A5, A6, A9, A16, B4, B5, *Human poliovirus* 1, 2, 3 (Sabin1, Sabin2, Sabin3)); вирусов гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусов, RS вирусов, аденовирусов человека – 3, 5, 7, 37, 40, 41 типов (клинические изоляты, специфичность подтверждена прямым секвенированием нуклеотидных последовательностей); штаммах *Acinetobacter baumannii* ATCC[®] 19606[™], *Bacteroides fragilis* ATCC[®] 25285[™], *Bordetella bronchiseptica* ATCC[®] 10580[™], *Bordetella bronchiseptica* ATCC[®] 4617[™], *Bordetella pertussis* ATCC[®] 9340[™], *Candida albicans* ATCC[®] 14053[™], *Candida guilliermondii* ATCC[®] 6260[™], *Candida krusei* ATCC[®] 14243[™], *Clostridium difficile* ATCC[®] 9689[™], *Clostridium septicum* ATCC[®] 12464[™], *Corynebacterium jeikeium* ATCC[®] 43734[™], *Corynebacterium xerosis* ATCC[®] 373[™], *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*) ATCC[®] 43055[™], *Enterobacter aerogenes* ATCC[®] 13048[™], *Enterobacter cloacae* ATCC[®] 13047[™], *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212[™], *Enterococcus faecalis* (*vancomycin resistant*) ATCC[®] 51299[™], *Enterococcus faecium* ATCC[®] 35667[™], *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC[®] 19414[™], *Escherichia coli* ATCC[®] 25922[™], *Escherichia coli* ATCC[®] 35218[™], *Fluoribacter* (*Legionella*) *dumoffii* ATCC[®] 33279[™], *Haemophilus influenzae* ATCC[®] 33930[™], *Haemophilus influenzae* ATCC[®] 9006[™], *Haemophilus influenzae* ATCC[®] 10211[™], *Haemophilus parainfluenzae* ATCC[®] 7901[™], *Klebsiella oxytoca* ATCC[®] 49131[™], *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 27736[™], *Legionella pneumophila* ATCC[®] 33152[™], *Listeria grayi* (*murrayi*) ATCC[®] 25401[™], *Listeria innocua* ATCC[®] 33090[™], *Listeria monocytogenes* ATCC[®] 7644[™], *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC[®] 25238[™], *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* ATCC[®] 8176[™], *Neisseria meningitidis* ATCC[®] 13102[™], *Neisseria meningitidis* ATCC[®] 13090[™], *Neisseria lactamica* ATCC[®] 23970[™], *Neisseria gonorrhoeae* ATCC[®] 19424[™], *Neisseria gonorrhoeae* ATCC[®] 49926[™], *Peptoniphilus* (*Peptostreptococcus*) *anaerobius* ATCC[®] 27337[™], *Proteus mirabilis* ATCC[®] 12453[™], *Proteus*

vulgaris ATCC[®] 6380[™], *Propionibacterium acnes* ATCC[®] 11827[™], *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 15442[™], *Rhodococcus equi* ATCC[®] 6939[™], *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC[®] 14028[™], *Serratia marcescens* ATCC[®] 14756[™], *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 6538P[™], *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC[®] 43300[™], *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213[™], *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923[™], *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 33862[™], *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC[®] 33591[™], *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC[®] 12600[™], *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228[™], *Staphylococcus haemolyticus* ATCC[®] 29970[™], *Staphylococcus saprophyticus* ATCC[®] 49907[™], *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC[®] 13637[™], *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC[®] 13637[™], *Streptococcus agalactiae* ATCC[®] 12386[™], *Streptococcus agalactiae* ATCC[®] 13813[™], *Streptococcus equisimilis* ATCC[®] 12388[™], *Streptococcus equi* subsp. *equi* ATCC[®] 9528[™], *Streptococcus bovis* (Group D) ATCC[®] 9809[™], *Streptococcus mutans* ATCC[®] 35668[™], *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 49619[™], *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 6303[™], *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 27336[™], *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 6305[™], *Streptococcus pyogenes* ATCC[®] 19615[™], *Streptococcus salivarius* ATCC[®] 13419[™], *Streptococcus uberis* ATCC[®] 700407[™], *Trichophyton mentagrophytes* ATCC[®] 9533[™], *Trichophyton mentagrophytes* ATCC[®] 9533[™], *Vibrio parahaemolyticus* ATCC[®] 17802[™], *Vibrio vulnificus* ATCC[®] 27562[™], *Moraxella catarrhalis* ATCC[®] 25240[™]. При проведении тестирования данных штаммов микроорганизмов, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Воспроизводимость и повторяемость

Вид исследуемого материала	Количество повторов	Коэффициент вариации CV, %
Разброс значений внутри одного теста		
Фекалии	8	1,71
Концентраты образцов воды	8	2,63
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	8	1,20
Разброс значений между тестами, проведенными в разные дни		
Фекалии	24	1,47
Концентраты образцов воды	24	2,57
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	24	2,04

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сравнительные характеристики набора реагентов:

Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения метода сравнения ³⁾	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Enterovirus-FL</i> »
Спинномозговая жидкость (СМЖ) ⁴⁾	140 шт	Положительных 50 Отрицательных 90	Положительных 52 ⁵⁾ Отрицательных 88
Фекалии ⁶⁾	402 шт	Положительных 52 Отрицательных 350	Положительных 56 ⁵⁾ Отрицательных 346
Концентраты образцов воды ⁷⁾	100 шт	Положительных 28 Отрицательных 72	Положительных 30 ⁵⁾ Отрицательных 70

В соответствии с представленными данными **диагностическая чувствительность** набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» (относительная чувствительность в сравнении с использованным методом сравнения) составляет для образцов СМЖ не менее 95 % с доверительной вероятностью 90 %, концентратов образцов воды не менее 93 % с доверительной вероятностью 90 %, для образцов фекалий не менее 96 % с доверительной вероятностью 90 %

Диагностическая специфичность набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» (относительная чувствительность в сравнении с использованным методом сравнения) составляет для образцов СМЖ не менее 95 % с доверительной вероятностью 90 % и концентратов образцов воды не менее 93 % с доверительной вероятностью 90 %, для образцов фекалий не менее 96 % с доверительной вероятностью 90 %.

³⁾ В качестве метода сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-EPH*» № ФСР 2010/06916 от 17.11.2011.

⁴⁾ Были использованы 12 образцов СМЖ от пациентов из очагов групповой заболеваемости *EV* 71 и 38 модельных образцов СМЖ со среднеклиническими концентрациями *EV*. Отрицательные по содержанию *EV* образцы СМЖ получены от пациентов с серозными и гнойными менингитами в период 2011-2013гг.

⁵⁾ Содержание РНК *EV* в дискордантных образцах (2 образца СМЖ, 4 образца фекалий, 2 образца концентратов воды) было подтверждено методом прямого секвенирования продукта амплификации, что позволяет связывать их появление с наличием в тестируемых образцах энтеровирусов, в концентрациях ниже заявленной аналитической чувствительности использованного метода сравнения.

⁶⁾ Были использованы 52 образца фекалий от пациентов с серозными менингитами энтеровирусной этиологии и клинически здоровых лиц, выделявших энтеровирус. Отрицательные по содержанию *EV* образцы фекалий получены от пациентов с острыми кишечными инфекциями (n=200) и клинически здоровых лиц (n=150) в период 2011-2013гг.

⁷⁾ Были использованы 30 модельных образцов концентратов воды (фильтровальный модуль с мембранами с «+» зарядом до 40мВ/см², элюция beef extract (Sigma Aldrich, США)), контаминированных среднестатистическими концентрациями *EV* (Coxsackievirus B5), характерными для содержания *EV* в сточных водах и 70 концентратов воды, отрицательных по содержанию *EV*.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Специфические воздействия на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Аллергическая реакция отсутствует.

Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции

РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар.-С», - «Ламинарные системы», Россия).
4. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

При детекции по «конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин», «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (с плоской крышкой, нестрипованные):
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл (Gradient Palm Cyclor, GeneAmp PCR System 2700, МахуGene);
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР 0,5 мл

(«Терцик»).

При детекции в режиме «реального времени»:

14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, США) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

Материалом для исследования служат образцы биологического материала (спинномозговая жидкость, образцы фекалий) и образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды) в соответствии с показаниями, представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции».

Условия хранения исследуемого материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;

– при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание исследуемого материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы спинномозговой жидкости и концентраты образцов воды не требуют предварительной подготовки.

Образцы фекалий требуют предварительной подготовки.

Подготовка образцов проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

ФОРМАТ FEP**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК, амплификации фрагмента кДНК (*Human enterovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ <i>Enterovirus / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ⁸⁾	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

⁸⁾ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] *Enterovirus-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используют комплект реагентов «РИБО-преп» или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракцию РНК из каждого клинического образца проводят в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес). В качестве отрицательного контроля экстракции используют реактив ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ

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

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

А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 1). Следует учитывать, что **для тестирования даже**

одного исследуемого образца необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок «Фон»). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов кДНК, реагентов и пробирок «Фон».
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать ПЦР-смесь-FL *Enterovirus / STI*, ПЦР-буфер-С и RT-G-mix-2 согласно табл. 1. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Приготовить 2 пробирки «Фон». Для этого внести по 15 мкл приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv)) в две пробирки «Фон», добавить по 10 мкл К-, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).
5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить полимеразу (TaqF) и ТМ-Ревертазу (MMIv) в количестве, указанном в табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых в реакционную смесь ферментов полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMIv), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

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

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 ⁹⁾	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	TM-Ревертаза (MMIv)
2	8	80	40	2,0	3,0	1,5
4	10	100	50	2,5	4,0	2,0
6	12	120	60	3,0	5,0	2,5
8	14	140	70	3,5	6,0	3,0
10	16	160	80	4,0	7,0	3,5
12	18	180	90	4,5	8,0	4,0
14	20	200	100	5,0	9,0	4,5
16	22	220	110	5,5	10,0	5,0
18	24	240	120	6,0	11,0	5,5
20	26	260	130	6,5	12,0	6,0
22	28	280	140	7,0	13,0	6,5
24	30	300	150	7,5	14,0	7,0
26	32	320	160	8,0	15,0	7,5
28	34	340	170	8,5	16,0	8,0

6. Внести в оставшиеся пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси. Сверху раскатать по 1 капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

7. Используя наконечники с фильтрами, в пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл РНК-проб, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа экстракции нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных сорбентным методом, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

8. Поставить контрольные реакции амплификации:

а) **отрицательный контроль (К-)** – внести в приготовленную пробирку с реакционной смесью **10 мкл К-;**

б) **положительный контроль (К+)** – внести в приготовленную пробирку **10 мкл К+ Enterovirus / STI;**

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить

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).

капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение ОТ-ПЦР

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должны превышать 10-15 мин.

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации

Цикл	Амплификаторы с активным регулированием ¹⁰⁾			Амплификаторы с активным регулированием ¹¹⁾			Амплификаторы с матричным регулированием ¹²⁾		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	42	95	10 с	42	95	1 мин	42
	60	10 с		60	25 с		60	1 мин	
	72	10 с		72	25 с		72	1 мин	
4	72	1 мин	1	72	1 мин	1	72	1 мин	1
5	10	хранение		10	хранение		10	хранение	

2. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам (см. табл. 3).

¹⁰⁾ Например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США).

¹¹⁾ Например, Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MAXYGENE (Axygen, США).

¹²⁾ Например, MiniCycler, PTC-100 (MJ Research, США), Uno-2 (Biometra, Германия).

Соответствие мишеней и каналов для флуорофора

Канал для флуорофора ¹³⁾	ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus</i> / STI
FAM	ВКО
JOE	кДНК <i>Enterovirus</i>

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб РНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 4.

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Уровень флуоресценции		Результат
Канал для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE	
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК <i>Enterovirus</i>
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК <i>Enterovirus</i>
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена РНК <i>Enterovirus</i>
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Результат невалидный - проба требует повторной экстракции и амплификации

¹³⁾ Название каналов для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как **сомнительный** и требует повторения ОТ-ПЦР-исследования соответствующего образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК в соответствии с табл. 5.

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
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+	ОТ-ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля амплификации (K+) сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*).
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) и/или отрицательного контроля амплификации (K-) по каналу JOE сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) начиная с этапа экстракции РНК.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК, амплификации фрагмента кДНК *Enterovirus (Human enterovirus)* с гибридационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-FL <i>Enterovirus / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ <i>Enterovirus / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ¹⁴⁾	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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»;
- анализ и интерпретация результатов.

¹⁴⁾ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] *Enterovirus-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК используют комплект реагентов «РИБО-преп» или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракцию РНК из каждого клинического образца проводят в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют реактив ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых образцов,

необходимо согласно расчетной таблице (см. табл. 6). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К-)). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых и контрольных образцов. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать **ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* /STI**, **ПЦР-буфер-С**, **полимеразу (TaqF)**, а также **RT-G-mix-2** и **ТМ-Ревертазу (MMIv)** в количестве, указанном в табл. 6. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.

**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 ¹⁵⁾	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
2	6	60	30	1,5	3,0	1,5
4	8	80	40	2,0	4,0	2,0
6	10	100	50	2,5	5,0	2,5
8	12	120	60	3,0	6,0	3,0
10	14	140	70	3,5	7,0	3,5
12	16	160	80	4,0	8,0	4,0
14	18	180	90	4,5	9,0	4,5
16	20	200	100	5,0	10,0	5,0
18	22	220	110	5,5	11,0	5,5
20	24	240	120	6,0	12,0	6,0
22	26	260	130	6,5	13,0	6,5
24	28	280	140	7,0	14,0	7,0
26	30	300	150	7,5	15,0	7,5
28	32	320	160	8,0	16,0	8,0

5. Используя наконечники с фильтрами, в пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл РНК-проб, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа экстракции нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных сорбентным методом, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

6. Поставить контрольные реакции амплификации:

а) **отрицательный контроль (К-)** – внести в приготовленную пробирку с реакционной смесью **10 мкл К-;**

б) **положительный контроль (К+)** – внести в приготовленную пробирку **10 мкл К+ *Enterovirus* / *STI*.**

Рекомендуется перед постановкой в амплификаторы планшетного типа осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

¹⁵⁾ 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).

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

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

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

Таблица 7

**Единая программа амплификации «АмплиСенс»
для приборов роторного¹⁶⁾ и планшетного¹⁷⁾ типа**

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	детекция флуоресц. сигнала	

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

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по двум каналам для флуорофоров FAM¹⁸⁾ и JOE¹⁸⁾.

Примечание - при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

¹⁶⁾ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях к набору реагентов.

¹⁷⁾ Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях к набору реагентов).

¹⁸⁾ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *Enterovirus (Human enterovirus)*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 8 и вкладываем к набору реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*».

Клиническая интерпретация результатов лабораторного исследования различных типов клинического материала проводится в соответствии с действующей нормативно-методической документацией.

Таблица 8

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Значение порогового цикла		Результат
Канал для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE	
<u>Меньше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	В пробе не выявлена РНК <i>Enterovirus</i>
<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	В пробе выявлена РНК <i>Enterovirus</i>
<u>Отсутствует или больше</u> граничного значения	<u>Отсутствует или больше</u> граничного значения	Результат невалидный - проба требует повторной экстракции и амплификации

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладываемом к набору реагентов. См. также методические

рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus* -FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК, в соответствии с табл. 9.

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE
OK	Экстракция РНК	<u>Меньше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения
K–	OT-ПЦР	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения
K+	OT-ПЦР	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (K+) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не была выявлена РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*).
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла *Ct* меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*), начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

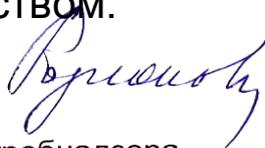
Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* / STI, ПЦР-буфер-С, RT-G-mix-2, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* / STI хранить в защищенном от света месте.

Гарантийные обязательства производителя. Предприятие-производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации по качеству набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2, тел. (495) 664-28-84, (495) 925-05-54, факс (495) 664-28-89, e-mail: products@pcr.ru¹⁹⁾.

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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел рекламаций по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ



Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

¹⁹⁾ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Дата изготовления



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для in vitro диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Производитель