СОГЛАСОВАНО
Заместитель Министра здравоохранения Республики Беларусь
_____ Д.Л. Пиневич
«16» 12 2019г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
_____ В.А. Горбунов
«16» сентября 2019г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ «ЭВ-ПЦР»

Извещение №1 об изменении

ТУ BY 100558032.366-2016

СОГЛАСОВАНО
Директор РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
_____ И. Марченко
«13» 12 2019 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
_____ Е.В. Ильяшева
14 мая 2019 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Минская городская инфекционная клиническая больница»
_____ Н. Н. Юровский
«20» августа 2019 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
_____ В. В. Рызгунский
2 сентября 2019 г.

Минск, 2019

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Тест-система для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР» представляет собой набор реагентов для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления кДНК/РНК энтеровирусов в клинических образцах пациентов (сыворотка и плазма крови, мазки из ротоглотки, СМЖ, фекалии, биопсийный и аутопсийный материал) и в объектах окружающей среды.

Основным свойством тест-системы является способность обнаруживать присутствие в исследуемом образце генетического материала энтеровирусов методом ПЦР. Накопление специфического продукта ПЦР выявляется за счет нарастания интенсивности флюоресценции после освобождения флюоресцентной метки в результате разрушения Taq-полимеразой гибридизационного зонда, связавшегося со специфическим участком кДНК, полученной с вирусной РНК.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу ROX для регистрации накопления продуктов амплификации фрагментов кДНК энтеровирусов и кДНК ВКО - по каналу FAM.

Постановку реакции следует производить в соответствии с требованиями безопасности при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, маске, сменном халате. Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими средствами.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для выявления кДНК/РНК энтеровирусов, в исследуемых образцах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Тест-система рассчитана на проведение 60 исследований, включая контроли.

2. СОСТАВ НАБОРА

Наименование компонента	Формы комплектации	
	Комплект - «ЭВ-ПЦР»	Комплект - «ЭВ-ПЦР»-OS
ПЦР-смесь №1, 0,455 мл;	1	-
ПЦР-смесь №1, 0,455 мл – OS;	-	1
ПЦР-смесь №2, 0,104 мл;	5	5
Taq – полимераза, 0,033 мл;	1	-
К+ ПЦР, 0,3 мл;	1	1
ОКО, 0,3 мл;	1	1
ПКО, 0,3 мл;	1	1
ВКО, 0,7 мл;	1	1

Набор реагентов рассчитан для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с целью выявления энтеровирусов.

Внимание: Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения РНК.

Для проведения исследований с помощью тест-системы дополнительно используют следующие реактивы, не входящие в его состав:

- Набор для выделения вирусной РНК – любой марки;
- Набор для обратной транскрипции – любой марки (при применении комплекта «ЭВ-ПЦР»).

3 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

инфекционных болезней, с соблюдением «Правил противоэпидемического режима при работе с микроорганизмами 3-4 группы патогенности».

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5%-ным раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку ПЦР осуществляют в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – выделение РНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, постановка реакции обратной транскрипции, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами, постановка ПЦР. Зона 3 – проведение амплификации. Пробы из Зоны 3 запрещается переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечению срока годности.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор для выделения вирусной РНК («Рибопреп» АмплиСенс, или аналогичный любой марки).

4.2 Набор для обратной транскрипции («РЕВЕРТА», Амплисенс, или аналогичный любой марки).

4.3 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, например CFX96, IQ 5 (Bio-Rad, США); Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Line-Gene 9660 (Bioer, Китай).

4.3 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biocom» или любой другой марки) либо стерильный ламинарный шкаф (например, Kojair KR-125 Safety или любой другой марки).

4.4 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100^0 С (например, «Biocom» или любой другой марки).

4.5 Центрифуга-вортекс (любой марки).

4.6 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин. (любой марки).

4.7 Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (любой марки).

4.8 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Gilson» либо любой другой марки).

4.9 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.10 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.11 Пробирки свободные от РНКаз и ДНКаз типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл и на 0,2 мл.

4.12 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.13 Холодильник на 2 – 8 °С и на минус 20 °С, морозильник на минус 20°С.

4.14 Ёмкость для сброса наконечников.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 Выделение РНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реактивы для выделения РНК НЕ ВХОДЯТ в состав настоящей тест-системы и должны приобретаться дополнительно.

Выделение РНК осуществляют с использованием соответствующих коммерческих наборов, согласно прилагаемой инструкции.

Перед началом выделения РНК:

- Маркируют необходимое количество пробирок из расчета N+2, где N – количество исследуемых образцов.
- Вносят в каждую пробирку по 90 мкл исследуемого образца и 10 мкл ВКО.
- В пробирку ОКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ВКО.
- В пробирку ПКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ПКО.

После чего приступают к выделению РНК в соответствии с инструкцией к используемому набору.

5.2 Проведение обратной транскрипции.

При применении комплекта - «ЭВ-ПЦР» необходимо дополнительно использовать набор для обратной транскрипции. Обратную транскрипцию проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору.

При использовании комплекта - «ЭВ-ПЦР»-OS реактивы для обратной транскрипции входят в состав набора и реакция проходит дополнительной стадией вовремя ПЦР.

5.3 Проведение ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

- Отобрать нужное количество пробирок с ПЦР-смесью №2 энтеро (каждая пробирка предназначена для проведения 12 реакций);
- Разморозить ПЦР-смесь №1 и нужное количество пробирок с ПЦР-смесью №2;
- Отобрать и промаркировать нужное количество (из расчета N+3, где N – количество исследуемых образцов) пробирок объемом 0,2 мл с прозрачной плоской крышкой;
- В каждую пробирку с ПЦР-смесью №2 внести 85 мкл ПЦР-смеси №1 и 6 мкл Taq-полимеразы, тщательно перемешать, осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с);
- Полученную реакционную смесь внести по 15 мкл в промаркированные пробирки.
- Внести в каждую пробирку по 10 мкл кДНК исследуемых образцов.
- Внести по 10 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО. **Для получения корректного результата реакции ОКО и ПКО должны проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения РНК.**
- Внести 10 мкл контрольного образца K^+ ПЦР энтеро.
- Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.
- Запрограммировать термоциклер с оптическим модулем следующим образом:

При применении комплекта - «ЭВ-ПЦР»:

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Преденатурация	95^0C	5 минут	1
2	Денатурация	95^0C	15 сек	45
	Отжиг *Детекция флюоресцентного сигнала*	59^0C	45 сек	

При использовании комплекта - «ЭВ-ПЦР»-OS:

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Обратная транскрипция	52^0C	15 минут	1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2	Преденатурация	95^{0}C	5 минут	1
3	Денатурация	95^{0}C	15 сек	45
	Отжиг *Детекция флуоресцентного сигнала*	59^{0}C	45 сек	

Детекция флюоресцентного сигнала осуществляется:
Для ВКО - по каналу для флуорофора FAM
Для кДНК энтеровирусов - по каналу для флуорофора ROX

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

5. 4 Анализ и интерпретация результатов.

Анализ результатов поводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM (ВКО) и ROX (кДНК/РНК энтеровирусов).

Для проведения анализа на приборе (Rotor Gene, или аналогичный) должны быть установлены следующие настройки:

«Dynamic tube»/ «Динамический фон» - включить
«Slope correct»/ «Коррекция уклона» - включить
«Outlier Removal» / «Устранение выбросов» - значение NTC threshold/Порог фона – 10%
«CT Calculation» / «Вычисление CT» - значение Threshold/ Порог = 0.05

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы кДНК/РНК энтеровирусов. При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции.

Интерпретируют результаты следующим образом:

- кДНК/РНК энтеровирусов обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла Ct ≤40 - для приборов планшетного типа, Ct ≤38 – для приборов роторного типа, по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла Ct ≤40 для приборов планшетного типа, Ct ≤38 – для приборов роторного типа.
- кДНК/РНК энтеровирусов не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла Ct ≤40 для приборов планшетного типа, Ct ≤38 – для приборов роторного типа, по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла не определено, или Ct ≥40 для приборов планшетного типа, Ct ≥38 – для приборов роторного типа.
- Результат реакции не валиден, если в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла не определено, или Ct ≥40 для приборов планшетного типа, Ct ≥38 – для приборов роторного типа.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если:

- для пробы ОКО по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла не определено, или Ct ≥40 для приборов планшетного типа, Ct ≥38 – для приборов роторного типа, по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла Ct ≤40 для приборов планшетного типа, Ct ≤38 – для приборов роторного типа;
- для пробы ПКО по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла Ct ≤40 - для приборов планшетного типа, Ct ≤38 – для приборов роторного типа, по каналу для флуорофора ROX определено значение

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

порогового цикла Ct ≤40 для приборов планшетного типа, Ct ≤38 – для приборов роторного типа.

6. ФОРМА ВЫПУСКА

«Тест-система для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР» выпускается в двух комплектациях «ЭВ-ПЦР» и «ЭВ-ПЦР»-OS в виде упакованного набора. Тест-система рассчитана на проведение 60 исследований, включая контроли.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при (-20±2) °С. Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре (+2,0±2)^{0}С в течение суток.

- Срок годности тест-системы – 9 месяцев с даты изготовления.

8. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ BY 100558032.404-2018 при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

Разработчики

Заведующая лабораторией	_____	Т.В. Амвросьева
Ведущий научный сотрудник	_____	Н.В. Поклонская
Младший научный сотрудник	_____	С. К. Лозюк
Научный сотрудник	_____	З.Ф. Богуш
Научный сотрудник	_____	О.Н. Казинец

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru