УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 30.12.09г. № 10815-Пр/09

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«10» 12 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

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

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК 9
ВАРИАНТ FEP 10
СОСТАВ 10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 10
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ 11
А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР 11
Б. Проведение ОТ-ПЦР 14
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» 14
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 15
ВАРИАНТ FRT 17
СОСТАВ 17
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 18
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 18
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 18
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР 18
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» 20
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 23

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
В-	- отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК
ПКО	- положительный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
кДНК	- комплементарная ДНК
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс®** ***Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL»** предназначен для выявления и дифференциации РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* A), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Для экстракции РНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора («РИБО-сорб» или «РИБО-преп»). При экстракции РНК из исследуемых образцов используется только РНК-элюент, входящий в состав набора реагентов **«АмплиСенс® *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL».**

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* A), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракция (выделение) РНК из образцов клинического материала, ОТ-ПЦР-амплификацию участка РНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция РНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-87-rec**), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции, в ходе

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

которой получают кДНК. Пробы кДНК используются для амплификации участка кДНК перечисленных выше возбудителей при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-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 варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК, амплификации и дифференциации кДНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* A), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) 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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Патоген	Вид клинического материала	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
Ротавирусы группы А (*Rotavirus* A)	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	$1x10^4$ ГЭ/мл
Норовирусы 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип)	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	$5x10^3$ ГЭ/мл
Астровирусы (*Astrovirus*)	фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	$1x10^4$ ГЭ/мл

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

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

Коллекция ГИСК им. Л.А. Тарасевича штаммы энтеровирусов (Coxsakie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio (Sabin) I, II, III). Также тестировались аденовирусы серогрупп 5 и 7; вирусы гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусы, RS вирусы, аденовирусы человека – 3, 5, 7, 37, 40 типов.

Коллекция ФГУ ВГНКИ: Salmonella enteritidis S-6, Salmonella choleraesuis 370, Salmonella typhimurium 371, Salmonella dublin 373, Salmonella typhi C1, Salmonella abortusovis 372, Salmonella gallinarum-pullorum, Shigella flexneri 851b, Campylobacter fetus subsp. fetus 25936, Campylobacter jejuni subsp. jejuni 43435, Clebsiella K 65 SW4, Listeria monocitogenes УСХЧ 19, Listeria monocitogenes УСХЧ 52, Proteus vulgaris 115/98, Pseudomonas aeruginosa ДН c1, Staphilococcus aureus 653, Staphilococcus aureus 29112, Morganella Morganii 619 c 01, Enterobacter faecalis 356

Коллекция Центра контроля и профилактики заболеваний (CDC, США): 44 изолята норовирусов различных генетических кластеров 1 и 2 генотипа, 40 штаммов ротавирусов различных [P]G типов, 19 штаммов астровирусов 1, 2, 4, 5, 8 серотипов и 15 штаммов аденовирусов различных типов и следующие бактериальные штаммы (см. табл. 1).

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

Таблица 1

Панель бактериальных агентов
Центра контроля и профилактики заболеваний (CDC, США)

Strain ID	Organism	Strain ID	Organism
K2033	*Salmonella* Ser. Grumpensis	K2015	*Salmonella* Ser. Oranienburg
K1806	*Salmonella* Ser. Newport	AM01144	*Salmonella* Ser. Newport
K2077	*Salmonella* Ser. Enteriditis	K1810	*Salmonella* Ser. Anatum
83-99	*Salmonella* Ser. Typhimurium	K1991	*Salmonella* Ser. Typhimurium
PS505	*Shigella boydii*	K1898	*Salmonella* Ser. Heidelberg
PS408	*Shigella sonnei*	PS555	*Shigella boydii*
B4003	*Shigella sonnei*	F6446	*Shigella dysenteriae*
PS801	*Shigella dysenteriae*	S821X1	*Shigella dysenteriae* type 1
C898	*Shigella dysenteriae* type1	S177X1	*Shigella dysenteriae* type 1
F2035	*Shigella flexneri*	S3314	*Shigella dysenteriae* type 2
E2539-C1	Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)	PS071	*Shigella flexneri*
H10407	Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)	PS050	*Shigella flexneri*
F1008	Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)	F7862	*Shigella flexneri*
EDL 933	Shiga-toxin *E. coli* (STEC)	TX1	Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)
3543-01	Shiga-toxin *E. coli* (STEC)	3525-01	Shiga-toxin *Escherichia coli* (STEC)
4752-71	*Proteus vulgaris*	25922	*Escherichia coli* O6:H1
QA/QC	*Citrobacter freundii*	621-64	*Citrobacter freundii*
QA/QC	*Aeromonas*	3910-68	*Aeromonas spp.*
3043-74	*Serratia marcescens*	E9113	*Vibrio cholerae*
QA/QC	*Serratia marcescens*	501-83	*Edwardsiella spp.*
F7894	*Vibrio vulnificus*	587-82	*Providencia stuartii*
F8515	*Yersinia enterocolitica*	27853	*Pseudomonas aeruginosa*
F8510	*Yersinia enterocolitica*	D4989	*Helicobacter cineadi*
K4299	*Vibrio parahaemolyticus*	D6827	*Helicobacter pullorum*
F9835	*Vibrio parahaemolyticus*	D5127	*Helicobacter pylori*
K2023	*Salmonella* Ser. Kentucky	D2686	*Arcobacter butzleri*
K1684	*Salmonella* 4,12:1:-		

При проведении тестирования данных панелей, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать с исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08

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

«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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Уничтожать неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FEP/FRT-50 F – от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.

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

9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

<u>При детекции по «конечной точке»:</u>

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «MAXYGENE» («Axygen», США), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems») или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (плоская крышка, нестрипованные) на 0,2 или 0,5 мл:
    а) объемом 0,2 мл (например, «Axygen», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл («Gradient Palm Cycler», «GeneAmp PCR System 2700», «MAXYGENE» и др.);
    б) объемом 0,5 мл (например, «Axygen», США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

<u>При детекции в режиме «реального времени»:</u>

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), «iQ5» («Bio-Rad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
    а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Axygen», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).
    б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Axygen», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»).

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, 2008 г.

Материалом для исследования служат образцы фекалий, концентраты образцов воды, подготовленные в соответствии с МУК 4.2.2029-05. «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов».

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Концентраты образцов воды не требуют специальной подготовки для экстракции РНК. Подготовка образцов фекалий проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

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

ВАРИАНТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК, амплификации и дифференциации кДНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* A), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus/Astrovirus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus*/STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК *Rotavirus*-Flu/*Astrovirus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК *Norovirus* 2 генотип-Flu/ STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон

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

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения и РНК-элюент:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
ВКО STI-87-rec[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

[1] В случае применения комплекта «РИБО-сорб» использовать ВКО STI-87-rec объемом 10 мкл на пробу.

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

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции РНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-rec).

ВНИМАНИЕ! При экстракции РНК из исследуемых образцов используется только РНК-элюент, входящий в состав набора реагентов **«АмплиСенс®** ***Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL».**

ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 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 кДНК 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. 2). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца кДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок «Фон» для каждого типа смеси).** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых,

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

контрольных образцов кДНК, реагентов и пробирок «Фон». Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.

3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ОТ-ПЦР-смесей-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*** или **ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI)**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT** и **RT-G-mix-2** согласно **табл. 2.** Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Приготовить 4 пробирки «**Фон**» (по две для каждого типа реакционной смеси). Для этого внести по 15 мкл приготовленных смесей (без полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMlv)) каждой в две пробирки **«Фон»**, добавить по 10 мкл **ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
5. В оставшиеся части реакционных смесей добавить **полимеразу (TaqF)** и **ТМ-Ревертазу (MMlv)** в количестве, согласно **табл. 2.** Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

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

6. Внести в оставшиеся пробирки по 15 мкл готовых реакционных смесей. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).

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

Таблица 2

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ПЦР С ДЕТЕКЦИЙ 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[2]	ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP /FRT	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMlv)
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

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемых полимеразы (TaqF) и ТМ-Ревертазы (MMlv) указано с вычетом двух пробирок «Фон».

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

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

8. Поставить контрольные реакции амплификации:

а) **отрицательный контроль (К-)** – внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера**;

б) **положительный контроль (К+** *Rotavirus/Astrovirus*) - внести в пробирки **10 мкл ПКО кДНК *Rotavirus*-Flu/*Astrovirus*** для **ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus***;

в) **положительный контроль (К+** *Norovirus 2* генотип/*STI* **)** - внести в пробирки **10 мкл ПКО кДНК *Norovirus* 2 генотип-Flu/STI** для **ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI.**

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

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

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить 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 должно превышать 10-15 мин.

Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 3):

Таблица 3

Программа амплификации

	Амплификаторы с активным регулированием[3]			Амплификаторы с активным регулированием[4]			Амплификаторы с матричным регулированием[5]		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
1	**50°C**	30 мин	1	**50°C**	30 мин	1	**50°C**	30 мин	1
2	**95 °C**	15 мин	1	**95 °C**	15 мин	1	**95 °C**	15 мин	1
3	**95 °C**	10 с	42	**95 °C**	10 с	42	**95 °C**	1 мин	42
	60 °C	10 с		**60 °C**	25 с		**60 °C**	1 мин	
	72 °C	10 с		**72 °C**	25 с		**72 °C**	1 мин	
4	**72 °C**	1 мин	1	**72 °C**	1 мин	1	**72 °C**	1 мин	1
5	**10 °C**	хранение		**10 °C**	хранение		**10 °C**	хранение	

По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ 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.

Таблица 4

Соответствие детектируемых патогенов каналам детекции и ОТ-ПЦР-смесям-1

Канал детекции	ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*	ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI
FAM/Green, FAM	кДНК *Rotavirus* grA	ВКО
JOE/Yellow, HEX	кДНК *Astrovirus*	кДНК *Norovirus* G2

[3] Например, «Терцик» («ДНК-Технология»), «GeneAmp PCR System 2400» («Perkin Elmer»).

[4] Например, «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «MAXYGENE» («Axygen»).

[5] Например, «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»), «Uno-2» («Biometra»).

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

ВАРИАНТ FEP

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к набору реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL».

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 клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 5.

Таблица 5

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь -1	Результат по уровню флуоресценции		Результат
	Канал FAM	Канал HEX	
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus/Astrovirus*	Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена РНК *Rotavirus* A
	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК *Astrovirus*
	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена РНК *Rotavirus* A и РНК *Astrovirus* [6]
	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК *Rotavirus* A и РНК *Astrovirus*
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена РНК *Norovirus* 2 генотип
	Ниже порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК *Norovirus* 2 генотип
	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Проба требует повторного перевыделения и тестирования на всех ПЦР-смесях 1
	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК *Norovirus* 2 генотип

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей

[6] при значении флуоресценции Выше порогового значения по каналу FAM при использовании ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI.

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

амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с табл. 6.

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап	Канал FAM	Канал HEX
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI	В-	Экстракция РНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К-	ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К+ *Norovirus 2 генотип/STI*	ПЦР	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus/Astrovirus*	В-	Экстракция РНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К-	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К+ *Rotavirus/Astrovirus*	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам HEX и FAM ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналам HEX и FAM был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ОТ-ПЦР-смеси-1.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В-) (кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналам HEX или FAM выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) РНК.

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

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК, амплификации и дифференциации кДНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* A), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **включает**:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus/Astrovirus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus*/STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	2 пробирки
ПКО кДНК *Rotavirus*-Flu/*Astrovirus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК *Norovirus* 2 генотип-Flu/ STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон

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

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения и РНК-элюент:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
ВКО STI-87-rec[7]	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок

[7] В случае применения комплекта «РИБО-сорб» использовать ВКО STI-87-rec объемом 10 мкл на пробу.

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов
- Обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения РНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-rec).

ВНИМАНИЕ! При экстракции РНК из исследуемых образцов используется только РНК-элюент, входящий в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL».

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

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 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 ОТ-ПЦР

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК 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. 7). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого образца РНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного контроля (К+) и отрицательного контроля (К-) для каждого типа смеси).**

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

Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов РНК/ДНК и кДНК, реагентов. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ОТ-ПЦР-смесей-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus*** или **ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI)**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, **полимеразу (TaqF)**, а также **RT-G-mix-2** и **ТМ-Ревертазу (MMlv)** в количестве, согласно **табл. 7.** Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по 15 мкл готовых реакционных смесей.

Таблица 7

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

		Объем реагентов на указанное количество реакций				
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Число исследуемых образцов	Число реакций[8]	ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP /FRT	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMlv)
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 аэрозольными барьерами, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл РНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

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

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

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

6. Поставить контрольные реакции амплификации:

   а) **отрицательный контроль (К-) –** внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера**;

   б) **положительный контроль (К+** *Rotavirus/Astrovirus***)** - внести в пробирки **10 мкл ПКО кДНК *Rotavirus*-Flu/*Astrovirus*** для **ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus***;

   в) **положительный контроль (К+** *Norovirus* **2 генотип/*STI*** **)** - внести в пробирки **10 мкл ПКО кДНК *Norovirus* 2 генотип-Flu/STI** для **ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI.**

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

Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9 и Методические Рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL»).

Таблица 8

Программа амплификации для приборов роторного типа[9]

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

Таблица 9

Программа амплификации для приборов планшетного типа[10]

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, HEX	
	72	10 с	–	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров

[9] Например, «RotorGene 3000» и « RotorGene 6000» («Corbett Research», Австралия)
[10] Например, « iQ5» («BioRad», США), «Mx3000P» («Cepheid», США)

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

FAM/Green и JOE/Yellow/HEX (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
2. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

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 двум каналам FAM/Green и JOE/Yellow/HEX.

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 РНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов. Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 10 и вкладышем к набору реагентов «АмплиСенс® *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus*-FL».

Таблица 10

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Канал детекции	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus* / *Astrovirus***	**ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI**
FAM/ Green	Определено значение меньше граничного – обнаружена кДНК *Rotavirus* grA Значение отсутствует или больше граничного – кДНК *Rotavirus* grA не обнаружена[11]	Определено значение меньше граничного – результаты тестирования образца валидны ВКО Значение отсутствует или больше граничного – результаты тестирования образца невалидны[12]
JOE/ Yellow/HEX	Определено значение меньше граничного – обнаружена кДНК *Astrovirus* Значение отсутствует или больше граничного – РНК *Astrovirus* не обнаружена[11]	Определено значение меньше граничного – обнаружена кДНК *Norovirus* G2 Значение отсутствует или больше граничного – РНК *Norovirus* G2 не обнаружена[11]

[11] При значении Ct по каналу FAM/Green для ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI меньше граничного.

[12] Если значение Ct по каналу FAM/Green для ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI отсутствует или больше граничного, то отрицательный результат анализа при использовании других ПЦР-смесей-1 считается невалидным и необходимо провести повторный ПЦР-анализ данного исследуемого образца, начиная с этапа выделения.

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

ВАРИАНТ FRT

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 11).

Таблица 11

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап	Результат амплификации по каналу	
			Green/FAM	Yellow/JOE
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI	В-	Экстракция РНК	Определено значение меньше граничного (Ct≤порог)	Значение отсутствует или больше граничного
	К+ *Norovirus* 2 генотип/STI	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
	К-	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus/ Astrovirus*	В-	Экстракция РНК	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного
	К+ *Rotavirus/ Astrovirus*	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
	К-	ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного	Значение отсутствует или больше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX и FAM/Green ниже порогового значения положительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX и FAM/Green, был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ОТ-ПЦР-смеси-1.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В-) (кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus* / STI и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу JOE/Yellow/HEX или FAM/Green выше порогового значения положительного результата необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) РНК.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Rotavirus / Astrovirus*, ОТ-ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Norovirus /* STI, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF), ТМ-ревертазы (MMlv) и RT-G-mix-2). ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Rotavirus / Astrovirus,* ОТ-ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Norovirus /* STI, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-ревертазу (MMlv) и RT-G-mix-2 хранить при температуре не выше минус 16°С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *Rotavirus/ Norovirus/Astrovirus*-FL»** направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний
Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК
им.Тарасевича Роспотребнадзора — Г.М.Игнатьев

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