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
«28» 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

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

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

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

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	- *Enterovirus*
EV 71	- *Enterovirus* 71 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 заболевания[1)].

[1)] В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/EC.

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

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-rec), 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 Taq-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 Taq-полимеразы. Химически модифицированная полимераза (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

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

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.

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

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 A (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), B, риновирусов, RS вирусов, аденовирусов человека – 3, 5, 7, 37, 40, 41 типов (клинические изоляты, специфичность подтверждена прямым секвенированием нуклеотидных последовательностей); штаммах *Acinetobacter baumanii* 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 infuenzae* 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*

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

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

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сравнительные характеристики набора реагентов:

Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения метода сравнения[3)]	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus*-FL»
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/см^2, 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*.

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

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», 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,

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

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

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

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, Axygen, 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.

<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, 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, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл (Gradient Palm Cycler, GeneAmp PCR System 2700, MaxyGene);
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР 0,5 мл

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

(«Терцик»).

<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), 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, Axygen, США) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, 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;

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

– 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.

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

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:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Количество*
ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* / STI	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 (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ *Enterovirus* / STI	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:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Количество*
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).

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

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-rec). 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**

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

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 (MMlv)) 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 (MMlv)** 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 (MMlv), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

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

Таблица 1

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

		Объем реагентов на указанное количество реакций				
Объем реагента на одну реакцию, мкл		**10,00**	**5,00**	**0,25**	**0,50**	**0,25**
Число исследуемых образцов	**Число реакций**[9)]	**ПЦР-смесь-FL**	**ПЦР-буфер-С**	**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**

6. Внести в оставшиеся пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси. Сверху раскапать 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).

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

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

	Амплификаторы с активным регулированием[10)]			Амплификаторы с активным регулированием[11)]			Амплификаторы с матричным регулированием[12)]		
Цикл	Темпе-ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе-ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе-ратура, °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 Cycler (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).

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

Таблица 3

Соответствие мишеней и каналов для флуорофора

Канал для флуорофора[13)]	**ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* / STI**
FAM	ВКО
JOE	кДНК *Enterovirus*

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 гибридизационно-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.

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Уровень флуоресценции		**Результат**
Канал для флуорофора FAM	**Канал для флуорофора JOE**	
Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК *Enterovirus*
Ниже порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена РНК *Enterovirus*
Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена РНК *Enterovirus*
Ниже порогового значения	Ниже 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.

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

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**
ОК	Экстракция РНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
К–	ОТ-ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
К+	ОТ-ПЦР	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

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

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

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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-FL *Enterovirus* / STI	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 (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ *Enterovirus* / STI	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:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
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 гибридизационно-флуоресцентой детекцией в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

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

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

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-rec). 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,

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

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 (MMlv)** 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.

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

Таблица 6

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**[15)]	**ПЦР-смесь-FL**	**ПЦР-буфер-С**	**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 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).

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

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 роторного[16] и планшетного[17] 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 FAM[18] и JOE[18].

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.

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

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 вкладышем 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**	
Меньше граничного значения	Значение отсутствует или больше граничного значения	В пробе **не выявлена** РНК *Enterovirus*
Больше или меньше граничного значения	Меньше граничного значения	В пробе **выявлена** РНК *Enterovirus*
Отсутствует или больше граничного значения	Отсутствует или больше граничного значения	Результат **невалидный** - проба требует повторной экстракции и амплификации

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические

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

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, *Ct***	
		по каналу для флуорофора FAM	**по каналу для флуорофора JOE**
ОК	Экстракция РНК	Меньше граничного значения	Значение отсутствует или больше граничного значения
К–	ОТ-ПЦР	Значение отсутствует или больше граничного значения	Значение отсутствует или больше граничного значения
К+	ОТ-ПЦР	Меньше граничного значения	Меньше граничного значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (К+) 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 (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) 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.

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. 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 разукомплектовать 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 (MMlv) 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.ru[19].

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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Код партии



Изделие для in vitro диагностики



Дата изменения



Ограничение температуры



Производитель



Дата изготовления



Максимальное число тестов



Использовать до



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Не допускать попадания солнечного света

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