

УТВЕРЖДАЮ

Директор РНПЦ эпидемиологии и
микробиологии



 В.А. Горбунов

28 АВГ 2023

2023 г.

**НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ КИШЕЧНЫХ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ (РОТА-, АДЕНО-, ЭНТЕРО-,
НОРОВИРУСНОЙ) И САНИТАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ
«ОКВИ-ПЦР»
инструкция по применению**

Минск, 2023 г.

Настоящая инструкция распространяется на наборы реагентов для генодиагностики кишечных вирусных инфекций (ротавирусной А, аденовирусной F, энтеровирусной, норовирусной I и II геногрупп) и санитарной вирусологии, далее по тексту «наборы», предназначенные для выявления РНК ротавирусов А, энтеровирусов, норовирусов I и II геногрупп, ДНК аденовирусов F в исследуемых образцах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени в клинических образцах пациентов и в объектах окружающей среды.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы предназначены для выявления ДНК/РНК кишечных вирусов (ротавирусов А, аденовирусов F, энтеровирусов, норовирусов I и II геногрупп) методом ПЦР/ОТ-ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Наборы рассчитаны на проведение 60 исследований (включая контроли) в отношении каждого из возбудителей, в зависимости от комплектации.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ И СОСТАВ НАБОРОВ

Наборы выпускаются в различных вариантах комплектации, которые включают:

- Маркировка «ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS» - наборы для проведения выделения нуклеиновых кислот и постановки реакции обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке
- Маркировка «ОКВИ-ПЦР-OS» - наборы для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке
- Маркировка «ОКВИ-ПЦР» - наборы для проведения только этапа ПЦР.

В названии набора после общего названия перечислены виды возбудителей, в отношении которых осуществляется детекция. Все виды комплектаций и состав наборов перечислены в таблице ниже:

Комплектация и состав наборов

№	Комплектация, обозначение	Состав наборов, количество реагентов, мл													
	1	2													
		«НК экстра»	ПЦР-смесь №1	ПЦР-смесь «One-step»	Норо I/ Норо II/ ВКО	Норо I/ Норо II	Адено F / ВКО	Адено F / Норо I	Рота / Норо II	Энтеро/ ВКО	ДНК-полимераза	К+	ПКО	ОКО	ВКО
1	ОКВИ-ПЦР-OS Норо I/Норо II			0,46	0,53							0,4	0,4	1,5	1,0
2	ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS Норо I/Норо II	+		0,46	0,53							0,4	0,4	1,5	1,0
3	ОКВИ-ПЦР Норо I/Норо II		0,46		0,53						0,035	0,4	0,4	1,5	1,0
4	ОКВИ-ПЦР-OS Норо I/Норо II/ Адено F			0,46x2		0,53	0,53					0,4	0,4	1,5	1,0
5	ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS Норо I/Норо II/ Адено F	+		0,46x2		0,53	0,53					0,4	0,4	1,5	1,0
6	ОКВИ-ПЦР Норо I/Норо II/ Адено F		0,46x2			0,53	0,53				0,07	0,4	0,4	1,5	1,0
7	ОКВИ-ПЦР скрин-OS (Рота/Норо I/Норо II/ Адено F/Энтеро)			0,46x3				0,53	0,53	0,53		0,4	0,4	1,5	1,0
8	ОКВИ-ПЦР скрин-экстракт-OS (Рота/Норо I/Норо II/ Адено F/Энтеро)	+		0,46x3				0,53	0,53	0,53		0,4	0,4	1,5	1,0
9	ОКВИ-ПЦР скрин (Рота/Норо I/Норо II/ Адено F/Энтеро)		0,46x3					0,53	0,53	0,53	0,1	0,4	0,4	1,5	1,0

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность наборов в отношении РНК ротавируса А, энтеровируса, норовирусов I и II геногрупп, ДНК аденовирусов F - 100 %;
Аналитическая чувствительность выявления РНК ротавирусов А - 10^3 ГЭ/мл;
Аналитическая чувствительность выявления РНК энтеровирусов - 10^3 ГЭ/мл;
Аналитическая чувствительность выявления РНК норовирусов I геногруппы - 10^3 ГЭ/мл;
Аналитическая чувствительность выявления РНК норовирусов II геногруппы - 10^3 ГЭ/мл;
Аналитическая чувствительность выявления ДНК аденовирусов F - 10^4 ГЭ/мл;

4 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента предприятия-изготовителя каждая серия наборов должна быть проверена и принята отделом биологического контроля (ОБК) изготовителя на соответствие всем показателям ТУ ВУ 100558032.404-2018

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 6.01.2017 № 2

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

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

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

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

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
Не использовать набор по истечению срока годности.

6 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

6.1 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, CFX96, IQ 5 Bio-Rad, США; Rotor-Gene 3000/6000 Corbett Research, Австралия.

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

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

6.4 Центрифуга-вортекс (любой марки).

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

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

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

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

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

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

6.11 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

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

6.13 Ёмкость для сброса наконечников.

7 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

7.1 Выделение РНК и проведение обратной транскрипции.

Если исследования проводят с использованием наборов формата «ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS», в состав которых входит набор реагентов для одновременного выделения ДНК и РНК из биологического материала методом преципитации «НК экстра» по ТУ ВУ 100558032.403-2018, то выделение РНК осуществляют согласно прилагаемой инструкции. Если исследования проводят с использованием наборов других форматов, то выделение ДНК и РНК проводят с использованием любых коммерческих наборов, которые предназначены для использования при работе с данным видом клинического материала в соответствии с инструкцией производителя.

Перед началом выделения РНК:

- Маркируют необходимое количество пробирок из расчета N+2, где N –

- количество исследуемых образцов.
- Вносят в каждую пробирку по 90 мкл исследуемого образца и 10 мкл ВКО.
- В пробирку ОКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ВКО.
- В пробирку ПКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ПКО.

Далее проводят процедуру выделения нуклеиновых кислот по инструкции.

После выделения нуклеиновых кислот необходимо провести реакцию обратной транскрипции. Если исследования проводят с использованием наборов формата «ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS», или «ОКВИ-ПЦР-OS», которые включают проведение обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке, то отдельно реакцию обратной транскрипции не проводят и сразу переходят к следующему разделу настоящей инструкции. Если исследования проводят с использованием наборов формата «ОКВИ-ПЦР», то реакцию обратной транскрипции проводят с помощью коммерческого набора в соответствии с инструкцией производителя.

7.2 Проведение ПЦР/ОТ-ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

- Разморозить реактивы, входящие в состав набора.
- Отобрать и промаркировать нужное количество (из расчета $N+4$, где N – количество исследуемых образцов) пробирок для ПЦР в реальном времени объемом 0,2 мл;
- Приготовить ПЦР-смеси в соответствии с таблицей №2

Таблица №2 – Приготовление ПЦР-смесей для разных вариантов комплектации набора

Комплектация наборов	Компонент набора				Тип используемой программы термоциклера
	ПЦР-смесь №1	ПЦР-смесь «One-step»	ПЦР-смесь №2*	ДНК-полимераза	
ОКВИ-ПЦР-OS Норо I/Норо II	-	7мкл $x(N+5)$	8мкл $x(N+5)$	-	№ 1
ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS Норо I/Норо II	-	7мкл $x(N+5)$	8мкл $x(N+5)$	-	№ 1
ОКВИ-ПЦР Норо I/Норо II	7мкл $x(N+5)$	-	8мкл $x(N+5)$	0,5мкл $x(N+5)$	№ 2
ОКВИ-ПЦР-OS Норо I/Норо II/ Адено F	-	2 пробирки 7мкл $x(N+5)$	8мкл $x(N+5)$	-	№ 1
ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS	-	2 пробирки 7мкл	8мкл $x(N+5)$	-	№ 1

Норо I/Норо II/ Адено F		x(N+5)			
ОКВИ-ПЦР Норо I/Норо II/ Адено F	2 пробирки 7мкл x(N+5)	-	8мкл x(N+5)	0,5мкл x(N+5)	№ 2
ОКВИ-ПЦР скрин-OS (Рота/Норо I/Норо II/ Адено F/Энтеро)	-	3 пробирки 7мкл x(N+5)	8мкл x(N+5)	-	№ 1
ОКВИ-ПЦР скрин-экстракт- OS (Рота/Норо I/Норо II/ Адено F/Энтеро)	-	3 пробирки 7мкл x(N+5)	8мкл x(N+5)	-	№ 1
ОКВИ-ПЦР скрин (Рота/Норо I/Норо II/ Адено F/Энтеро)	3 пробирки 7мкл x(N+5)	-	8мкл x(N+5)	0,5мкл x(N+5)	№ 2

*может быть использовано одна, или несколько (максимум 3) ПЦР-смеси №2, в зависимости от комплектации. Для каждой ПЦР-смеси готовят отдельную реакционную смесь.

**N – количество исследуемых проб

Наборы могут комплектоваться 1, 2, или 3 видами ПЦР-смеси №2, в зависимости от количества выявляемых возбудителей. Количество приготовленных реакционных смесей должно соответствовать количеству видов ПЦР-смеси №2, в зависимости от комплектации набора.

– После добавления каждого компонента набора осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с);

– Полученную реакционную смесь внести по 15 мкл в промаркированные пробирки.

– Внести в каждую пробирку по 10 мкл выделенной РНК/ДНК исследуемых образцов.

– Внести по 10 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО. Для получения корректного результата реакции ОКО и ПКО должны проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения РНК/ДНК.

– Внести 10 мкл контрольных образцов К⁺ ПЦР и ОКО (без выделения, в качестве отрицательного контроля ПЦР). Данные контрольные образцы используются для контроля только этапа ПЦР.

– Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы

– 10 мкл;

– Ввести в термоциклер программу № 1 для наборов формата «ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS» и «ОКВИ-ПЦР-OS», или программу №2 - для наборов формата «ОКВИ-ПЦР». Выбор конкретной программы для каждой комплектации указан в таблице №2 настоящей инструкции.

Программа № 1 – для наборов формата «ОКВИ-ПЦР-экстракт-OS», или «ОКВИ-ПЦР-OS»

№	Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
1	Обратная транскрипция	52 ⁰ С	45 минут	1
2	Преденатурация	95 ⁰ С	10 минут	1
3	Денатурация	95 ⁰ С	10 сек	45
	Отжиг <i>Детекция флуоресцентного сигнала</i>	56 ⁰ С	30 сек	
	Элонгация	67 ⁰ С	15 сек	

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется по каналам для флуорофоров FAM и ROX, в зависимости от комплектации набора.

Программа № 2 – для наборов формата «ОКВИ-ПЦР»

№	Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
1	Преденатурация	95 ⁰ С	5 минут	1
2	Денатурация	95 ⁰ С	10 сек	45
	Отжиг <i>Детекция флуоресцентного сигнала</i>	56 ⁰ С	30 сек	
	Элонгация	67 ⁰ С	15 сек	

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется по каналам для флуорофоров FAM и ROX, в зависимости от комплектации наборов.

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 каналу для флуорофора FAM и ROX.

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

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

«CT Calculation» / «Вычисление СТ» - значение Threshold/ Порог = 0.05

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

Проводят учет результатов реакции для ВКО, анализируя кривую накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM. Результат реакции оценивается как положительный, если значения порогового цикла (Ct) ниже или равно 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Результат реакции оценивается как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют, или превышают 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа.

Проводят учет результатов реакции для РНК/ДНК ротавирусов А, норовирусов I и II геногрупп, аденовирусов F, энтеровирусов, анализируя кривую накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофоров FAM/ROX (в зависимости от комплектации). Результат реакции оценивается как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют, или превышают 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Таблица, в которой указаны каналы детекции и пороговые циклы для конкретного возбудителя поставляется в виде листка-вкладыша к набору.

Важно! В зависимости от комплектации набора каналы детекции для одного и того же возбудителя могут меняться, поэтому учет производят на основании информации из листка-вкладыша к конкретному набору.

8 ФОРМА ВЫПУСКА

Наборы для детекции ДНК/РНК кишечных вирусов (ротавирусов А, аденовирусов F, энтеровирусов, норовирусов I и II геногрупп) методом ПЦР/ОТ-ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной выпускаются в виде упакованного набора. Наборы рассчитана на проведение 60 исследований в отношении каждого возбудителя (в зависимости от комплектации), включая контроли.

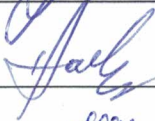
9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Наборы хранят при $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Транспортирование наборов должно производиться при температуре $(+2,0 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение суток. Срок годности набора – 9 месяцев с даты изготовления.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ ВУ 100558032.404-2018 изм 1 при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

Разработчики

Ведущий научный сотрудник			Н.В. Поклонская
Заведующая лабораторией			Т.В. Амвросьева
Младший научный сотрудник			Ю.А. Шилова
Научный сотрудник			З.Ф. Богуш
Научный сотрудник			О.Н. Казинец