

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
« 21 » 08 2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) в
объектах окружающей среды и биологическом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК.....	12
ФОРМАТ FRT.....	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР.....	14
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».....	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22

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
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
EV	- <i>Enterovirus</i>
EV71	- <i>Enterovirus 71</i> типа

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*» предназначен для выявления РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) в биологическом материале (у лиц с подозрением на энтеровирусную инфекцию вне зависимости от формы и наличия ее манифестации) и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов предназначен для качественного определения и используется для клинической лабораторной диагностики.

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа)

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

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя два этапа: экстракцию РНК из исследуемых образцов и объединенный этап обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракцию РНК из биологического материала и образцов объектов окружающей среды проводят в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы РНК используют для проведения реакции обратной транскрипции и амплификации участка кДНК энтеровируса 71 типа при помощи фермента Таq-полимеразы и специфичных к этому участку праймеров. 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. Детекцию флуоресцентного сигнала при использовании формата FRT осуществляют непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

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

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 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 фрагмента кДНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или аналогичные).

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

Для данного набора реагентов применимы следующие 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-сорб», «РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ³
Фекалии	«РИБО-сорб», «РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ⁴

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*

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

coxsackievirus A4, A5, A6, A9, A16, B4, B5, *Human poliovirus* 1, 2, 3 (Sabin1, Sabin2, Sabin3)); вирусов гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусов, RS вирусов, аденовирусов человека – 3, 5, 7, 37, 40, 41 типов (клинические изоляты, специфичность подтверждена прямым секвенированием нуклеотидных последовательностей); штаммах микроорганизмов и образцах ДНК – ДНК человека, штаммах *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617™, *Bordetella pertussis* ATCC® 9340™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida guilliermondii* ATCC® 6260™, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Clostridium difficile* ATCC® 9689™, *Clostridium septicum* ATCC® 12464™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Eggerthella lenta (Eubacterium lentum)* ATCC® 43055™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Enterococcus faecalis (vancomycin resistant)* ATCC® 51299™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC® 19414™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Escherichia coli* ATCC® 35218™, *Fluoribacter (Legionella) dumoffii* ATCC® 33279™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 9006™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211™, *Haemophilus parainfluenzae* ATCC® 7901™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Legionella pneumophila* ATCC® 33152™, *Listeria grayi (murrayi)* ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC® 25238™, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ATCC® 8176™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49926™, *Peptoniphilus (Peptostreptococcus) anaerobius* ATCC® 27337™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Propionibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* ATCC® 14028™, *Serratia marcescens* ATCC®

14756™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 43300™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33862™, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 33591™, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 12600™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC® 29970™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 49907™, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637™, *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™, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802™, *Vibrio vulnificus* ATCC® 27562™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™. При проведении тестирования данных панелей, 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	0,49
Концентраты образцов воды	8	0,49
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	8	1,21
Разброс значений между тестами, проведенными в разные дни		
Фекалии	16	1,72
Концентраты образцов воды	16	2,27
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	16	1,91

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сравнительные характеристики набора реагентов:

Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения метода сравнения ³⁾	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Enterovirus 71-FL</i> »
Спинномозговая жидкость (СМЖ) ⁴⁾	100 шт	Положительных 19 Отрицательных 81	Положительных 30 ⁵⁾ Отрицательных 70
Фекалии ⁶⁾	416 шт	Положительных 58 Отрицательных 358	Положительных 66 ⁵⁾ Отрицательных 350
Концентраты образцов воды ⁷⁾	100 шт	Положительных 22 Отрицательных 78	Положительных 30 ⁵⁾ Отрицательных 70

В соответствии с представленными данными **диагностическая чувствительность** набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*» (относительная чувствительность в сравнении с использованным методом сравнения) составляет для образцов СМЖ и 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 71-FL*» (относительная специфичность в сравнении с использованным методом сравнения) составляет для образцов СМЖ и концентратов образцов воды не менее 93 % с доверительной вероятностью

³⁾ В качестве метода сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*» № ФСР 2008/02264 от 29.07.2014 с проведением генотипирования позитивных образцов методом прямого секвенирования по методике Nix et al. 2006.

⁴⁾ Были использованы 12 образцов СМЖ от пациентов из очагов групповой заболеваемости *EV 71* и 18 модельных образцов СМЖ со среднеклиническими концентрациями *EV*. Отрицательные по содержанию *EV 71* образцы СМЖ получены от пациентов с серозными и гнойными менингитами в период 2011-2013гг.

⁵⁾ Содержание РНК *EV 71* в дискордантных образцах (11 образцов СМЖ, 8 образцов фекалий и 8 образцов концентратов воды) было подтверждено методом прямого секвенирования продукта амплификации, что позволяет связывать их появление с более низкой аналитической чувствительностью метода сравнения (Nix et al. 2006).

⁶⁾ Были использованы 36 образцов фекалий от пациентов из очагов групповой заболеваемости *EV 71* и 30 модельных образцов фекалий со среднеклиническими концентрациями *EV*. Отрицательные по содержанию *EV 71* образцы фекалий получены от пациентов с острыми кишечными инфекциями (n=200) и клинически здоровых лиц (n=150) в период 2011-2013гг.

⁷⁾ Были использованы 30 модельных образцов концентратов воды (фильтровальный модуль с мембранами с «+» зарядом до 40мВ/см², элюция beef extract (Sigma Aldrich, США)), контаминированных среднестатистическими концентрациями *EV 71*, характерными для содержания *EV* в сточных водах, и 70 концентратов воды, отрицательных по содержанию *EV 71*.

90 %, для образцов фекалий не менее 96 % с доверительной вероятностью 90 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического 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, 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-сорб» (РУ № ФСР 2008/03993), «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, ООО «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.
11. 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).
12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, США) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного

- типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, 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.

Для проведения анализа используют различные типы биологического материала (спинномозговая жидкость, образцы фекалий) и образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды) в соответствии с МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции».

Условия хранения материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ 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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2010 г.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК, амплификации фрагмента кДНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
ПЦР-смесь-FL EV 71 / 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 (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ EV 71 / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Количество</i>
ВКО STI-87-гес	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов;
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-

исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) в объектах окружающей среды и биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Экстракцию РНК из каждого исследуемого образца проводят в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-87-rec⁸⁾**). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

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

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

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР

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

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

⁸⁾ В случае применения комплекта реагентов «РИБО-сорб» использовать ВКО STI-87-rec объемом 10 мкл на пробу.

включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 1). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого образца необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного (К+) и отрицательного (К-) контролей)**. 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 EV 71 /STI, ПЦР-буфер-С, RT-G-mix-2, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv)** в количестве согласно табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей для ОТ-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 ⁹⁾	ПЦР-смесь-FL EV 71 /STI	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
2	6	60	30	1,5	3,0	1,5
4	8	80	40	2,0	4,0	2,0
6	10	100	50	2,5	5,0	2,5
8	12	120	60	3,0	6,0	3,0
10	14	140	70	3,5	7,0	3,5
12	16	160	80	4,0	8,0	4,0
14	18	180	90	4,5	9,0	4,5
16	20	200	100	5,0	10,0	5,0

⁹⁾ 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).

		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 EV 71 / STI	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
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**, экстрагированных из исследуемых или контрольных проб этапа экстракции нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении РНК-проб, экстрагированных 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 приготовленную пробирку с реакционной смесью **10 мкл К-**;

б) **положительный контроль (К+)** – внести в приготовленную пробирку с реакционной смесью **10 мкл К+ EV 71 / STI**.

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

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. 2).

Таблица 2

**Единая программа амплификации «АмплиСенс»
для приборов роторного¹⁰⁾ и планшетного¹¹⁾ типов**

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! При использовании единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по двум каналам – для флуорофоров FAM¹²⁾ и JOE.

Примечание – При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция по всем используемым каналам.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого 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

¹⁰⁾ 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.

¹¹⁾ Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях к набору реагентов.

¹²⁾ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

кДНК ВКО,

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа).

Результаты интерпретируют 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 интерпретируют в соответствии с **табл. 3** и вкладышем к набору реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus 71-FL*».

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

Таблица 3

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Значение порогового цикла Ct		Результат
Канал для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE	
Меньше граничного значения	Значение отсутствует или больше граничного значения	В пробе не выявлена РНК <i>Enterovirus 71</i> типа
Больше или меньше граничного значения	Меньше граничного значения	В пробе выявлена РНК <i>Enterovirus 71</i> типа
Отсутствует или больше граничного значения	Отсутствует или больше граничного значения	Результат невалидный - проба требует повторного ПЦР-исследования (начиная с этапа экстракции РНК)

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК энтеровируса 71 типа (*Enterovirus 71* типа) в объектах окружающей среды и в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Enterovirus 71-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. 4.

Таблица 4

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (K+) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить OT-ПЦР и детекцию для всех образцов, в которых не была выявлена РНК *Enterovirus 71* типа.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла *Ct* меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *Enterovirus 71* типа, начиная с этапа экстракции РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

Хранение. Набор реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме ПЦР-смеси-FL EV 71 / STI, ПЦР-буфера-С, RT-G-mix-2, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMIv)). ПЦР-смесь-FL EV 71 / STI, ПЦР-буфер-С, RT-G-mix-2, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL EV 71 / 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 (9 мес) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации по качеству набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus 71-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.¹³⁾

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

И.о. генерального директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»



В.Н. Михеев

¹³⁾ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		