

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор центра постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

Г.А. Шипулин

« 11 »

12

2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК
энтеровирусов и парэховирусов человека
методом полимеразной цепной реакции
«АмплиТест® Нейровирусы»



ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
119121, Российская Федерация,
г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ	4
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	5
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ	5
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	11
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	21
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	24
А. Подготовка проб для амплификации	24
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	29
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	30
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГА	- гемагглютинирующая активность
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК-мишени (1 копия), содержащейся в 1 геноме вируса
ГКВ	- государственная коллекция вирусов
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
НК	- нуклеиновые кислоты
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИБ	- потенциально интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
СанПиН	- санитарно-эпидемиологические правила и нормы
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
TCID ₅₀ /мл	- тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя
LD ₅₀ /мл	- средняя летальная доза, вызывающая гибель 50% животных
EV	- <i>Enterovirus</i> (энтеровирус)
PeV	- <i>Parechovirus</i> (пареховирус)

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК энтеровирусов и парэховирусов человека методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® Нейровирусы», (далее – набор реагентов «АмплиТест® Нейровирусы», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для качественного определения РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) видов / кластеров А, В, С, D, без дифференцировки между ними, и РНК парэховирусов человека (*Human parechovirus*) видов / кластеров А, В, без дифференцировки между ними, в биологическом материале человека (мазки со слизистой носоглотки, спинномозговая жидкость (СМЖ), фекалии) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – для диагностики *in vitro*, а именно для выявления РНК энтеровирусов и парэховирусов человека.

Популяционные, демографические аспекты применения

Выявление РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) видов / кластеров А, В, С, D, без дифференцировки между ними, и РНК парэховирусов человека (*Human parechovirus*) видов / кластеров А, В, без дифференцировки между ними, методом ПЦР проводится пациентам с клинической симптоматикой и при подозрении на инфекции, вызванные данными возбудителями, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам, вне зависимости от их половой и возрастной категории, расовой принадлежности.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический надзор.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на энтеровирусную и/или парэховирусную инфекции вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в том числе при вспышках данных инфекций для ранней диагностики.

Противопоказания к применению отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип исследования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), с проведением на следующем этапе реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых вирусов и кДНК ВКО IC-R1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

ВКО IC-R1 позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования, служит для исключения ложноотрицательных результатов.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью ревертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, 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 осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

При исследовании одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции – реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК энтеровируса человека (*Human enterovirus*), реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК парэховируса человека (*Human parechovirus*), реакция обратной транскрипции РНК и амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации регистрируются по 3 различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM	JOE (HEX)	ROX
кДНК-мишень	ВКО IC-R1	<i>Human enterovirus</i>	<i>Human parechovirus</i>
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	5'UTR	5'UTR

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ

Набор реагентов выпускается в одной форме комплектации и включает комплекты реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Набор реагентов предназначен для проведения полного ОТ-ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», что позволяет определять РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*) и парэховирусов (*Human parechovirus*) в качественном формате.

Набор реагентов рассчитан на проведение 50 определений, включая контроли.

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® Нейровирусы»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

СОСТАВ

«РИБО-преп ЭВ» вариант 50 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	15,0	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20,0	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25,0	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	1 флакон

К комплекту реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 50 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПКО РНК EV-РeV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

¹ При хранении при температуре от 2 до 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

«РИБО-преп ЭВ» вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 образцов, включая контроли.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК энтеровирусов (*Human enterovirus*) и парэховирусов (*Human parechovirus*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL EV-РeV	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Тaq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Реввертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 50 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 50 тестов), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® Нейровирусы»

Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	1×10 ³
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	
Фекалии	5×10 ³

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании штаммов энтеровируса ЕСНО типа 1 «Faroun T10 ГKB 171» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 2 «Cornelis ГKB 172» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 3 «Morrisey ГKB 173» ($1 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 5 «Noyce ГKB 175» (1×10^7 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 6 «ГKB 2166» (1×10^7 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 7 «Wallance ГKB 177» ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 8 «Bryson ГKB 178» ($1 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 9 «Hill ГKB 179» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 11 «Влад/б ГKB 2271» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 12 «Travis 2-85 ГKB 181» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 13 «Hamphill ГKB 182» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 15 «Charleston Ch 96-511 ГKB 183» ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 17 «Chee-29 ГKB 184» (1×10^4 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 20 «JV-1 ГKB 187» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 21 «Farina ГKB 188» ($1 \times 10^{2,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 24 «De Camp ГKB 189» ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса типа 71 «EV71 ГKB1750» (1×10^4 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки А7 «МКВ-4 ГKB 2298» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки А9 «МКВ-5 ГKB 2299» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В1 «МКВ-6 ГKB2300» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В2 «МКВ-7 ГKB2301» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В3 «МКВ-8 ГKB 2302» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В4 «МКВ-9 ГKB 2303» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В5 «МКВ-10 ГKB 2304» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В6 «МКВ-11 ГKB 2305» (1×10^6 TCID₅₀/мл), вируса кори «Mvi/Moscow.Rus/05.99 ГKB2360» (1×10^5 TCID₅₀/мл), вируса краснухи «Орлов ГKB1707» ($0,5 \times 10^4$ TCID₅₀/мл), вируса эпидемического паротита «Драгун-1 ГKB2353» (5×10^6 TCID₅₀/мл), вируса гриппа А (H2N3) (А/Утка/Германия-1215/73) ($1 \times 10^{5,5}$ LD₅₀/мл), вируса Западного Нила «48-3H ГKB 932/2» (5×10^5 LD₅₀/мл) из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского; полиовируса тип 1 Sabin, вакцинный «LSc2ab» (1×10^8 TCID₅₀/мл) из коллекции ФГБНУ

«ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН; вируса гриппа А (H3N2) (А/Красноярск/НИИГ-20/21) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H1N1) pdm (А/С.-Петербург/НИИГ-94/20) (1:32 ГА), вируса простого герпеса I типа «248/Ленинград/88» (1×10^6 TCID₅₀/мл), риновируса человека 1А типа ($2,16 \times 10^7$ ГЭ/мл), риновируса человека 13 типа (6×10^7 ГЭ/мл), риновируса человека 15 типа ($3,07 \times 10^7$ ГЭ/мл), риновируса человека 17 типа ($2,15 \times 10^7$ ГЭ/мл), риновируса человека 26 типа ($2,96 \times 10^5$ ГЭ/мл), риновируса человека 29 типа ($9,44 \times 10^4$ ГЭ/мл) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.С.Смородинцева; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 из коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России ($1,3 \times 10^7$ копий/мл); препарат геномной ДНК человека № D7011 («Sigma-Aldrich», США) (0,2 мг/мл). При тестировании вышеперечисленных образцов неспецифических (ложноположительных или ложноотрицательных) реакций (результатов) выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК энтеровируса (*Human enterovirus*) и пареховируса (*Human parechovirus*) и внутреннего контрольного образца (ВКО IC-R1). ВКО IC-R1 добавляется в каждый образец биологического материала на этапе экстракции РНК. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы, объем, условия/срок хранения и транспортировки которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции выбрали эндогенные (муцин, гемоглобин, глюкоза) и экзогенные (лидокаин, дексаметазон, диклофенак натрия, водный раствор хлоргексидина биглюконата, йод) вещества, которые могут присутство-

вать в исследуемом образце биологического материала (мазках со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ) и фекалиях).

Результаты оценки представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ

Биологический материал	Вид ПИВ	Потенциальный интерферент	Концентрация в образце	Наличие интерференции
Мазки	Эндогенные вещества	Муцин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Лидокаин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Дексаметазон	1,53 ммоль/л	Не обнаружено
		Водный раствор хлор-гексидина биглюконата, 0,05 %	51,4 ммоль/л	Не обнаружено
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Йод, раствор для наружного применения спиртовой 5 %	до 0,03 %	Не обнаружено
Фекалии	Эндогенные вещества	Муцин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Лидокаин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Диклофенак натрия	169 мкмоль/л	Не обнаружено

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования (с учетом повторяемости) была определена для набора реагентов в двух лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах.

Испытания показали 100 % воспроизводимость и повторяемость результатов исследования.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) набора реагентов представлены в табл 4.

Таблица 4 – Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® Нейровирусы»

Показатель	Тип используемых образцов биологического материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
РНК энтеровируса	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	90,0-100 %	92,9-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	86,3-100 %	92,9-100 %
	Фекалии	90,0-100 %	92,9-100 %
РНК парэховируса	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,3-100 %	94,0-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	86,3-100 %	92,9-100 %
	Фекалии	86,3-100 %	94,0-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, должны проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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 предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и

слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Среда для хранения и транспортировки респираторных мазков «АмплиТест® TCP» (РУ № РЗН 2022/16719, производства ФГБУ ЦСП, Россия, или аналогичный).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб.
3. Шпатель медицинский деревянный стерильный одноразовый размером 150 мм x 18 мм.
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл.
5. Иглы пункционные.
6. Пипетка для переноса жидкости, стерильная, градуированная, 2,0 мл.
7. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный.

Предварительная подготовка исследуемого материала

8. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
9. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся или завинчивающиеся пробирки с крышками объемом 1,5 - 2,0 мл.
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл.
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
12. Микроцентрифуга-вортекс.
13. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл.
14. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g.
15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
17. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

18. Ламинарный бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
19. Микроцентрифуга-вортекс.
20. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью нагрева от 25 до 100 °С.
21. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл.
22. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
23. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
24. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100, до 200 и до

- 1000 мкл.
25. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл.
 26. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников.
 27. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g.
 28. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 29. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 30. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

31. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл для приготовления реакционной смеси.
 - тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
 - тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
32. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, 100, 200 и 1000 мкл.
33. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
34. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
35. Микроцентрифуга-вортекс.
36. Механические дозаторы переменного объема с возможностью дозирования от 0,5 до 10 мкл, от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл.

37. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий не менее 4 независимых каналов флуоресцентной детекции (FAM, HEX, ROX, Cy5), зарегистрированный в РФ и удовлетворяющий следующим требованиям:

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры не более $\pm 0,4$ °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

Клинические испытания проведены с использованием следующих приборов: Rotor-Gene Q (ПУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (ПУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ПУ № ФСР 2011/10229).

38. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

39. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

40. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки;
- спинномозговая жидкость (СМЖ);
- фекалии.

Работы по взятию, транспортировке и хранению исследуемого материала должны проводиться в соответствии с показаниями, представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции» или актуальной версии данного документа, действующей на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как один образец. Для этого берут мазки разными зондами сна-

чала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мазки со слизистой нижнего носового хода

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Для взятия мазков используют сухие стерильные зонды из полистирола с вязкими тампонами. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5–6 см). После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Мазки с задней стенки ротоглотки

Образцы берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют. Допускается хранение материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

Спинномозговая жидкость (СМЖ)

Спинномозговую жидкость отобрать в асептических условиях методом аспирации в объёме не менее 1,0 мл в пробирку или контейнер с использованием одноразовых пункционных игл. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение материала до проведения исследования в течение 24 ч при температуре 2-8 °С, при температуре от -24 до -16 °С – не более 1 недели, при температуре не выше -68 °С – длительно. Допускается замораживание-оттаивание материала не более двух раз.

Фекалии

Взятие фекалий произвести из подгузника или предварительно продезинфицированного и промытого от следов дезинфектанта горшка или подкладного судна, на дно которого помещён **одноразовый полиэтиленовый пакет**. При дефекации нежелательно попадание в судно мочи.

ВНИМАНИЕ! Не допускается забор образца фекалий непосредственно из судна для дефекации или другой емкости многократного использования (вне зависимости от методов их дезинфекции).

Фекалии массой (объёмом) примерно 1,0–3,0 г (1,0–3,0 мл) переносят в одноразовую герметичную емкость из полипропилена, забор осуществляют из нескольких мест. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно. Допускается замораживание-оттаивание материала не более двух раз.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Мазки со слизистой носо- и ротоглотки

Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

Образцы спинномозговой жидкости (СМЖ)

Образцы спинномозговой жидкости не требуют предварительной подготовки. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

Фекалии

В микроцентрифужную пробирку (объемом 1,5 мл) вносят 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии (~10 %).

Центрифугируют суспензии фекалий 5 мин при 7000 g (10 тыс об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf). Супернатант (осветленный экстракт фекалий) в объеме 50 мкл используют для экстракции НК.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку **10 мкл ВКО IC-R1**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

3. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО** внести по **100 мкл** подготовленных проб из мазков со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ), используя наконечники с аэрозольным барьером.

ВНИМАНИЕ! Для экстрактов фекалий в пробирки с **раствором для лизиса и ВКО** внести **50 мкл** проб и **50 мкл** фосфатного буфера, используя наконечники с аэрозольным барьером.

4. В пробирку отрицательного контроля (**ОК**) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (**ПК**) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О РНК EV-ReV**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин** при температуре **65 °C** в термостате.
6. Снова центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)**.
9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** без фильтра для каждой пробы.
10. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
11. Центрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.

12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на **200 мкл** для каждой пробы.
13. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
14. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
15. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник без фильтра на **200 мкл**.
16. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
17. В каждую пробирку с пробами экстрагированных образцов мазков со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ) и в пробирки положительного (ПК) и отрицательного (ОК) контролей экстракции добавить по **50 мкл РНК-буфера**.
В каждую пробирку с пробами экстрагированных образцов фекалий добавить по **150 мкл РНК-буфера**.
18. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
19. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК/ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °C – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °C.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL EV-ReV, 5 мкл ОТ-ПЦР-буфера-R, 0,5 мкл Taq полимеразы, 0,25 мкл Ревертазы (MMiv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 6) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

ВНИМАНИЕ! Taq полимеразу, Ревертазу (MMiv) необходимо доставать непосредственно в момент приготовления реакционной смеси и убирать в морозильную камеру сразу же после ее добавления в реакционную смесь.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL EV-ReV**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL EV-ReV, ОТ-ПЦР-буфера-R, Taq полимеразы, Ревертазы (MMiv)**, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции и ОТ-ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК EV-ReV**.
 - б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5).

Таблица 5 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного³ и планшетного⁴ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	15 с	-	45
	60	30 с	FAM, JOE (HEX), ROX	
	72	15 с	-	

³ Rotor-Gene Q (QIAGEN)

⁴ CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технология)

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

1. Анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам в соответствии с таблицей 1 настоящей инструкции.

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 кДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 6).

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации РНК в соответствии с таблицей 7 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 6 — Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE (HEX)	ROX	
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено	Обнаружена РНК энтеровируса
определено или отсутствует	отсутствует или определено	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена РНК парэховируса
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружена РНК энтеровируса и парэховируса
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

Таблица 7 — Контроль достоверности этапов экстракции РНК, обратной транскрипции и амплификация с детекцией в режиме «реального времени»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE (HEX)	ROX
ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров JOE(HEX) и ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов (начиная с этапа экстракции РНК).
2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM и/или JOE(HEX) и/или ROX. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора JOE(HEX) и/или JOE(HEX)/ROX. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (параметрах базовой линии), требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование.

Набор реагентов транспортировать при температуре от плюс 2 до плюс 8 °C не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Набор реагентов при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Комплект реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 50 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКO РНК EV-РeV, ВКО IC-R1 и OKO хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °C.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °C.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °C.

ПЦР-смесь-FL EV-РeV хранить в защищенном от света месте.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F не более 3 раз.

Набор реагентов при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1, e-mail: promlab@cspfmmba.ru.

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 по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Руководитель
производственной лаборатории

Ж.Е.Тарасова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения $<n>$ тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления



Знаки опасности