

«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

« 19 »

09

2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК

энтеровирусов человека (*Human enterovirus*)

с идентификацией энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа)

методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест® Энтеровирус+68»



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.....	9
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	13
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	17
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	23
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	24
Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100.....	25
Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100, методика ручной экстракции с использованием магнитного штатива.....	27
Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100, методика автоматической экстракции	29
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	32
А. Подготовка проб для амплификации	32
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	33
В. Анализ и интерпретация результатов.....	34
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	37
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	40

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 и ОТ-ПЦР
ПКО	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 40 ПКО РНК EV-D68	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК энтеровируса 68 типа
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ТСID ₅₀ /мл, ТЦД ₅₀ /мл	- тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя
LD ₅₀ /мл, ЛД ₅₀ /мл	- средняя летальная доза, вызывающая гибель 50% животных
EV/ЭВ	- <i>Enterovirus</i> (энтеровирус)

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) с идентификацией энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа) методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® Энтеровирус+68», (далее – набор реагентов «АмплиТест® Энтеровирус+68», набор реагентов).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для качественного определения РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) видов / кластеров А, В, С, D, без дифференцировки между ними с идентификацией энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа) в биологическом материале (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговая жидкость (СМЖ), фекалии) и объектах окружающей среды (концентраты образцов воды) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – для диагностики *in vitro*, а именно для выявления РНК энтеровирусов человека с идентификацией энтеровируса 68 типа.

Популяционные, демографические аспекты применения

Выявление РНК энтеровирусов человека (*Human enterovirus*) видов / кластеров А, В, С, D, без дифференцировки между ними с идентификацией энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа) методом ПЦР проводится пациентам всех возрастных групп 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.

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

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

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 Таq-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 ОТ-ПЦР – реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК энтеровирусов (*Human enterovirus*), реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа), а также 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)	Cy5
кДНК-мишень	ВКО IC-R1	энтеровирус	энтеровирус 68 типа
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	5'UTR	5'UTR

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ

Набор реагентов выпускается в двух формах комплектации.

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-96.

Форма 2 включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-96.

Все формы комплектации набора реагентов предназначены для выполнения полного ОТ-ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», что позволяет определять РНК энтеровирусов (*Human enterovirus*) и энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа) в качественном формате.

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений, включая контроли.

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® Энтеровирус+68»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

СОСТАВ

«РИБО-преп ЭВ» вариант 100 – 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	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон

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

К комплекту реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК EV-D68	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

«РИБО-преп ЭВ» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 1.

«Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100 - комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	50	1 флакон
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	1	2 пробирки
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	70	1 флакон
Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон

К комплекту реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК EV-D68	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

«Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 2.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК энтеровирусов (*Human enterovirus*) и энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL EV-D68	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Тақ полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 96 тестов), включая контроли. Входит в состав форм 1 и 2.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® Энтеровирус+68»

Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Спинномозговая жидкость (СМЖ)	5×10 ³
Концентраты образцов воды	
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	
Фекалии	1×10 ⁴

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 РНК/ДНК штаммов следующих микроорганизмов: штаммов энтеровируса ЕСНО типа 1 «Штамм Farouq T10 ГKB 171» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 2 «Штамм Cornelis ГKB 172» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 3 «Штамм Morrisey ГKB 173» ($1 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 5 «Штамм Noyce ГKB 175» (1×10^7 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 6 ГKB 2166» (1×10^7 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 7 «Штамм Wallance ГKB 177» ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 8 «Штамм Bryson ГKB 178» ($1 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 9 «Штамм Hill ГKB 179» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 11 «Штамм Влад/б ГKB 2271» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 12 «Штамм Travis 2-85 ГKB 181» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 13 «Штамм Hamphill ГKB 182» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 15 «Штамм Charleston Ch 96-511 ГKB 183» ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 17 «Штамм Chee-29 ГKB 184» (1×10^4 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 20 «Штамм JV-1 ГKB 187» (1×10^5 TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 21 «Штамм Farina ГKB 188» ($1 \times 10^{2,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса ЕСНО типа 24 «Штамм De Camp ГKB 189» ($1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/мл), энтеровируса типа 71 «Штамм EV71 ГKB1750» (1×10^4 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки А7 «Штамм МКВ-4 ГKB 2298» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки А9 «Штамм МКВ-5 ГKB 2299» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В1 «Штамм МКВ-6 ГKB2300» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В2 «Штамм МКВ-7 ГKB2301» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В3 «Штамм МКВ-8 ГKB 2302» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В4 «Штамм МКВ-9 ГKB 2303» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В5 «Штамм МКВ-10 ГKB 2304» (1×10^6 TCID₅₀/мл), энтеровируса Коксаки В6 «Штамм МКВ-11 ГKB 2305» (1×10^6 TCID₅₀/мл),

«Mvi/Moscow.Rus/05.99 ГKB2360» вируса кори (1×10^5 TCID₅₀/мл), «Орлов ГKB1707» вируса краснухи ($0,5 \times 10^4$ TCID₅₀/мл), «Драгун-1 ГKB2353» вируса эпидемического паротита (5×10^6 TCID₅₀/мл), вируса гриппа А (H2N3) (А/Утка/Германия-1215/73) ($1 \times 10^{5,5}$ LD₅₀/мл) из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского; штаммов 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.Сморodinцева; штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 из коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России ($1,3 \times 10^7$ копий/мл), а также препарата 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 энтеровируса 68 типа (*Enterovirus* 68 типа) 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 присутствовать в исследуемом образце биологического материала человека (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговая жидкость (СМЖ) и фекалии). Для оценки потенциальной интерференции в концентратах образцов воды использовали магния хлорид и экстракт биогуруса, которые могут присутствовать в объектах окружающей среды.

Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты испытываемым набором реагентов были протестированы модельные образцы, содержащие и не содержащие эндогенные и экзогенные потенциально интерферирующие вещества. Модельные образцы представляли собой образцы мазка со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ), фекалий, концентрата образца воды, не содержащие РНК энтеровируса (*Human enterovirus*) и энтеровируса 68 типа (*Enterovirus 68* типа), контаминированные разведениями стандартного образца предприятия СОП № 40 ПКО РНК EV-D68 до конечной концентрации 5×10^3 ГЭ/мл для мазка со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ) и концентрата образца воды, и 1×10^4 ГЭ/мл для фекалий. Исследовали образцы с добавлением эндогенных и экзогенных ПИВ (испытываемые образцы) и без добавления данных веществ (контрольные образцы). Вычисляли разницу полученных средних значений порогового цикла Ct (ΔCt_{cp}) между испытываемыми и контрольными образцами. При значении ΔCt_{cp} менее 1,5 циклов делали вывод об отсутствии влияния потенциально интерферирующих веществ на результат ОТ-ПЦР.

Экстракцию РНК из модельных образцов и ОТ-ПЦР проводили в соответствии с Инструкцией по применению.

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/дл	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 хлоргексидина биглюконата, 0,05%	51,4 ммоль/л	Не обнаружено
Спинно-мозговая жидкость (СМЖ)	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л (верхняя граница нормы 3,89 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/дл	Не обнаружено
		Гемоглобин	5 мг/дл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Лидокаин	2 мг/мл	Не обнаружено
		Диклофенак натрия	169 мкмоль/л	Не обнаружено
Концентраты образцов воды		Раствор магния хлорида 50 мМ	10 ммоль/л	Не обнаружено
		Экстракт биогуруса	0,5 %	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 результатов исследования.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Таблица 4 – Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® Энтеровирус+68»

Показатель	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
РНК энтеровируса	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	95,2-100 %	91,19-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	92,89-100 %	92,13-100 %
	Фекалии	92,89-100 %	92,89-100 %
	Концентраты образцов воды	92,89-100 %	91,19-100 %
РНК энтеровируса 68 типа	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	86,28-100 %	95,98-100 %
	Спинномозговая жидкость (СМЖ)	86,28-100 %	94,87-100 %
	Фекалии	86,28-100 %	95,2-100 %
	Концентраты образцов воды	86,28-100 %	94,48-100 %

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» 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

- Проводить исследования 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 может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

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

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 клиничко-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® ТСП» (РУ № РЗН 2022/16719, производства ФГБУ ЦСП, Россия, или аналогичный).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
4. Иглы пункционные (например, Gebruder Martin GmbH & Co. KG (Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ), Германия, или аналогичные).
5. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся или завинчивающиеся пробирки с крышками объемом 1,5 - 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США,

- или аналогичные).
3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
 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. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. При использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» применяется автоматическая станция для экстракции НК (например, станция Auto-Pure 96 («Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd.», Китай), РУ № РЗН 2021/14263), зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:
 - возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с данной Инструкцией;
 - наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнитного сорбента;
 - наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;
 - наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.

3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2,0 мл (например, «Promega», США).
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axugen», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, «Axugen», США).
11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл (например, «Axugen», США).
12. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axugen», США).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

– тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм («ДНК Технология», 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.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки;
- спинномозговая жидкость (СМЖ);
- фекалии;
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды).

Работы по взятию, транспортировке и хранению исследуемого материала должны проводиться в соответствии с показаниями, представленными в МУ 3.1.1.4015-24 «Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор за энтеровирусной (неполио) инфекцией» 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 сначала 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 методом аспирации в объёме не менее 1,0 мл в пробирку или контейнер путём прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков пункционными иглами. 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 однократное замораживание–оттаивание материала.

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.

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

Использовать пробы фекалий массой (объёмом) ~1,0-3,0 г (~1,0-3,0 мл), которые необходимо забирать из нескольких мест пипеткой, лопаточкой. Допускается хранение до проведения исследования в течении 1 суток при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание – оттаивание материала.

Объекты окружающей среды (концентраты образцов воды)

Взятие образцов воды и последующее концентрирование производится в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов» или актуальной версией данного документа, действующего на территории Российской Федерации на момент проведения исследований. Допускается хранение образцов концентратов воды до проведения ПЦР-исследования: – при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток; – при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца; – при температуре не выше минус 68 °С – длительно. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Допускается транспортирование концентратов образцов воды при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Концентраты образцов воды

Подготовка производится в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов» или актуальной версией данного документа, действующего на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

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)

В одноразовую пробирку объемом 1,5 мл отобрать 1 мл спинномозговой жидкости (СМЖ). Центрифугировать в течение 5 мин при 8-9 тыс g (12-13 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf). Удалить надосадочную жидкость, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученную пробу после тщательного перемешивания на вортексе и осаждения капель со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с использовать для экстракции НК.

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). Надосадочную жидкость (осветленный экстракт фекалий) используют для экстракции РНК.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридационно-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».

Для экстракции РНК из подготовленных мазков со слизистой носо- и ротоглотки и фекалий используется комплект реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100 или «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100.

Для экстракции РНК из подготовленных образцов спинномозговой жидкости (СМЖ) используется комплект реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100.

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

Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С 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, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции и **ОТ-ПЦР (ПК)** внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК EV-D68**.
4. 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 °С** в термостате.
5. Снова центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
6. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.

7. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** без фильтра для каждой пробы.
9. 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.
10. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на **200 мкл** для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник без фильтра на **200 мкл**.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ) и в пробирки положительного (ПК) и отрицательного (ОК) контролей экстракции по **50 мкл РНК-буфера**.

В каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов фекалий добавить по **150 мкл РНК-буфера**.

17. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
18. 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.

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

Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100, методика ручной экстракции с использованием магнитного штатива

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Промаркировать пробирки.
3. Смешать в отдельной пробирке на 1,5 мл **ВКО IC-R1, Буфер GT и Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО IC-R1, 10 мкл Буфера GT и 20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.
4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента.
5. Добавить в пробирки **500 мкл Лизирующего буфера Комбо**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим буфером **100 мкл исследуемого образца** и тщательно перемешать на вортексе.
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **100 мкл ОК**. В пробирку положительного контроля

экстракции и ОТ-ПЦР (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК EV-D68**.

8. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.
9. Прогреть пробирки **5 мин при температуре 60 °С** в термостате.
10. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**.
Необходимо открыть крышки до постановки в магнитный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно открыть без взмучивания сорбента.
11. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно отобрать надосадочную жидкость по внутренней стенке, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки Комбо-1**, закрыть крышки.
Необходимо поставить пробирки в обычный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно плотно закрыть крышки.
13. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**.
14. Открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость как описано выше.
15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки Комбо-2**, перемешать на вортексе, затем осадить капли кратким центрифугированием.
16. Поместить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость.
17. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **5-10 минут**.
18. Добавить в каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ) и в пробирки положительного (ПК)

и отрицательного (ОК) контролей экстракции по **100 мкл Элюирующего буфера**.

В каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов фекалий добавить по **200 мкл Элюирующего буфера**.

19. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С** на **5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
19. Кратко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
20. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.
21. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, перенести надосадочную жидкость в новые пробирки.

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

Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100, методика автоматической экстракции

ВНИМАНИЕ! К работе с автоматической станцией может быть допущен только персонал, прошедший обучение. Программирование последовательности действий, указанной ниже, осуществляется с использованием инструкции к конкретному виду станции.

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Смешать в отдельной пробирке **ВКО IC-R1, Буфер GT и Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО IC-R1, 10 мкл Буфера GT и 20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.
3. Внести в пробирки или лунки глубоколоночного планшета (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов по **40 мкл подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента**.

4. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT и магнитного сорбента **500 мкл Лизирующего буфера Комбо**.
5. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT, магнитного сорбента и Лизирующего буфера Комбо по **100 мкл исследуемых образцов**.
6. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции и ОТ-ПЦР (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК EV-D68**.
7. Для станций с магнитным штативом поместить на борт автоматической станции емкости с **Раствором для отмывки Комбо-1, Раствором для отмывки Комбо-2 и Элюирующим буфером**. Для станций с магнитными стержнями внести в лунки соответствующих глубоколоночных планшетов, размещаемых на автоматической станции, по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1, 500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2** и по **100 мкл Элюирующего буфера** при экстракции из мазков со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ), отрицательного (ОК) и положительного (ПК) контролей и по **200 мкл Элюирующего буфера** при экстракции из фекалий.
8. Установить пробирки или планшет с исследуемыми и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктами 5 и 6, на борт автоматической станции.
9. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми и контрольными образцами **при температуре 60 °С в течении 5 мин**.
10. Для станций с магнитным штативом поместить пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в магнитный штатив на **1 мин**. Для станций с магнитными стержнями опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин**.
11. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные

- стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-1.
12. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.
 13. Повторить пункт 10.
 14. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-2.
 15. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.
 16. Повторить пункт 10.
 17. Для станций с магнитным штативом высушить магнетизированную силику, оставив открытые пробирки на магнитном штативе в течение **10 минут**. Для станций с магнитными стержнями высушить магнетизированную силику оставив магнитные стержни с намагниченным сорбентом на открытом воздухе в течение **5 минут**.
 18. Для станций с магнитным штативом добавить в каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов со слизистой носо- и ротоглотки, спинномозговой жидкости (СМЖ) и в пробирки положительного (ПК) и отрицательного (ОК) контролей выделения по **100 мкл Элюирующего буфера**.
В каждую пробирку с пробами из экстрагированных образцов фекалий добавить по **200 мкл Элюирующего буфера**.
 19. Для станций с магнитными стержнями поместить магнитные стержни в лунки планшета с элюирующим буфером. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами при температуре **60 °С** в течение **5 мин**.
 20. Для станций с магнитным штативом перенести раствор в чистые пробирки, не вынимая пробирки с магнитным сорбентом из магнитного штатива. Для станций с магнитными

стержнями удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.

21. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

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

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-D68, 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 б) 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-D68. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: ПЦР-смеси-FL EV-D68, 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-D68**.
 - 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, 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, °С	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), Cy5	
	72	15 с	-	

- 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.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

- 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

³ Rotor-Gene Q (QIAGEN)

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

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

Таблица 6 – Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE (HEX)	Sy5	
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Обнаружена РНК энтеровируса, НЕ обнаружена РНК энтеровируса 68 типа
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного*	Обнаружена РНК энтеровируса, РНК энтеровируса 68 типа
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружена РНК энтеровируса
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	Невалидный**
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**
<u>определено</u> меньше граничного	Для одного или нескольких флуорофоров (JOE (HEX) и/или Sy5) определено C_t больше граничного		Сомнительный***

* В случае, если наблюдается значительная разница пороговых циклов между каналами **JOE (HEX)** и **Sy5**, $\Delta(C_{t_{Sy5}} - C_{t_{JOE}}) \geq 10$, результат интерпретируется как «**Обнаружена** РНК энтеровируса, **НЕ обнаружена** РНК энтеровируса 68 типа».

** 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.

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 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)	Sy5
ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	<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 Sy5 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 Sy5. 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)/Sy5. 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 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

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

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «РИБО-преп ЭВ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО РНК EV-D68, ВКО IC-R1 и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

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

ПЦР-смесь-FL EV-D68 хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Форма 2. Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ЭВ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКO PНК EV-D68, BKO IC-R1 и OKO хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °C.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 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-D68 хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 2 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@cspfmba.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 регулирующую 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