



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления кДНК вируса денге (субтипов 1-4) методом полимеразной цепной
реакции в режиме реального времени

«Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RC»

НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Полное название набора

Набор реагентов для выявления кДНК вируса денге (субтипов 1-4) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG»

1.2. Предназначение набора и его диагностическая роль

Медицинское изделие для *in vitro* диагностики «Набор реагентов для выявления кДНК вируса денге (субтипов 1-4) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG» предназначено для качественного определения (скрининг, мониторинг) кДНК вируса денге в препаратах НК, выделенных из проб: клинических образцов, вирусосодержащей суспензии, насекомых, биопсийного и аутопсийного материала.

Диагностическая роль набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG» заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфических патологий (лихорадки денге) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА); как ускоренного предварительного теста при выполнении культурального и биологического методов исследования и идентификации подозрительных культур; для эпидемиологического мониторинга.

1.3. Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика лихорадки денге, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования.

Набор может быть использован в лабораториях специализированных противозидемических бригад Роспотребнадзора (без накопления возбудителя вирусологическими методами), а также в изолированных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства Обороны.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. СОСТАВ

Набор «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG» – комплект реагентов для выявления кДНК, предварительно синтезированной на матрице РНК вируса денге (субтипов 1-4) в реакции обратной транскрипции, состоит из 4 компонентов:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Реагент-1-DENV	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка
Реагент-2-DENV	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка
ПКО-DENV	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка
ОКО-DENV	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка

Реакционная смесь, **Реагент-1-DENV**, расфасована в пробирку из полипропилена вместимостью 1,5 мл, состав: эквимольная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер, хлорид магния, восемь олигонуклеотидных праймеров, четыре флуоресцентных зонда.

Реакционная смесь, **Реагент-2-DENV**, расфасована в пробирку из полипропилена вместимостью 1,5 мл, состав: фермент Taq ДНК-полимераза, ПЦР-буфер, деионизованная вода.

Положительный контрольный образец, **ПКО-DENV**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл, состав: рекомбинантная плазмиды, несущая специфическую вставку для вируса денге.

Отрицательный контрольный образец, **ОКО-ПОКС**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл, состав: буфер TE.

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига, составляющая 52 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на проведение 20 реакций амплификации, включая контроли.

Внимание! Реагенты для выделения НК из биологического материала в состав набора не входят! Реагенты для проведения обратной транскрипции в состав набора не входят!

Для полного анализа необходимо дополнительно использовать набор реагентов для выделения РНК/ДНК из биологического материала комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК их клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп» производства ООО «НекстБио» (ФСР 2012/1407) или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке и Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (например, «Реверта-L» ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия или аналогичные наборы реагентов других производителей).

2.3. Метод исследования

Метод основан на многократном увеличении числа копий фрагмента вирусных нуклеиновых кислот (комплементарной ДНК – кДНК) с одновременной гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР_{РВ}) и далее по тексту подобрана система, состоящая из пары праймеров и флуоресцентно-меченого зонда, несущего на 5'-конце флуоресцентный краситель, на 3'-конце – гаситель. Праймеры обеспечивают специфичную амплификацию фрагментов кДНК, предварительно синтезированных на матрице РНК. Данные фрагменты соответствуют нуклеотидной последовательности участка генома вируса денге. Гибридизованный к матрице зонд во время элонгации цепи ДНК разрушается за счет 5'-экзонуклеазной активности полимеразы, при этом происходит расхождение в пространстве флуорофора и гасителя, что ведет к накоплению флуоресценции. Накопление флуоресцентного сигнала, фиксируемого прибором, соответствует накоплению продуктов амплификации в реакции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области) и на кафедре клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России (г. Москва) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний. При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех исследуемых образцов

3.1.1. Чувствительность. Набор реагентов должен выявлять 10^4 копий кДНК вируса денге в 30 мкл реакционной смеси.

3.1.2. Специфичность. Набор реагентов не должен давать положительных результатов в ПЦР с образцами здоровых доноров или образцами, содержащими генетический материал вирусов клещевого энцефалита, желтой лихорадки, японского энцефалита, лихорадки Западного Нила.

3.2. Диагностические характеристики

Клинические исследования набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области). При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – при исследовании 294 положительных образцов, содержащих кДНК вируса денге в концентрации не менее 3×10^5 копий/мл (соответствует 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси), положительный результат в ПЦР получен для всех 294 образцов. Диагностическая чувствительность – не менее 98 % с доверительной

вероятностью 90 %.

3.2.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 180 (2 по 90) отрицательных образцов, содержащих НК гетерологичных микроорганизмов (вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита) и 8 (2 по 4) отрицательных образцов, содержащих ДНК человека отрицательный результат в ПЦР получен для 188 образцов. Диагностическая специфичность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. ПЦР-анализ выполняется в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1. Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности, не имеющих противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3. Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4. Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР в реальном времени – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий канал детекции, соответствующий красителю JOE (либо его спектральные аналоги), например, Rotor-Gene 6600-100 (Corbett Research, Австралия), CFX 96, (Bio-Rad, США).

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в ламинарном боксе 2-го класса биологической защиты (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1.5(0.1), ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл и на 20-200 мкл;

штатив для данных пипеток.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга (например, «Centrifuge 5415D» ("Eppendorf", Германия));

Встряхиватель пробирок (например, «FV-2400» ("SIA "BIOSAN", Латвия));

штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

холодильник на 2-8 °C.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 200 мкл;

набор реагентов для выделения ДНК/РНК (например, «РИБО-сорб», «РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) или аналогичные наборы реагентов других производителей);

набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (например, «Рсверта-Л» ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) или аналогичные наборы реагентов других производителей);

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность вирусом денге, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG».

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусом денге, проводят в изолированных лабораториях в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

6.1. Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб клинических образцов, вируссодержащей суспензии, биопсийного и аутопсийного материала.

6.2. Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследуемые пробы хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С не более одного месяца, при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года, не допуская его оттаивания до проведения исследования.

При замораживании клинического материала его транспортировка также должна проводиться в замороженном состоянии. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов.

6.3. Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса денге, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10) и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

6.4. Обеззараживание проб и получение препарата кДНК

Обеззараживание проб проводят в лаборатории в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Пробы, содержащие вирус денге, в объеме 1 мл переносят в микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл, добавляют натрия мертиолят до концентрации 1:10000 (0,01 %) и прогревают при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Затем в отдельные микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл переносят по 100 мкл обработанных мертиолятом натрия проб вирусов. Во все пробирки добавляют лизирующий буфер на основе 6М гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения РНК, и инкубируют 15 минут при температуре $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Выделение РНК из клинических образцов и секционного материала осуществляют за пределами BSL-3 в ПЦР боксе в защитном костюме IV типа, дополненном резиновыми перчатками, с соблюдением правил выноса предметов из BSL-3 (внешняя обработка контейнера). Выделение осуществляют с использованием наборов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия), или аналогичных наборов реагентов других производителей, зарегистрированных в установленном порядке. Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2°C до 8°C или в течение месяца при температуре не выше минус 16°C , допускается более длительное хранение при температуре не выше минус 68°C . Синтез кДНК проводится с использованием наборов

реагентов для проведения реакции обратной транскрипции, например, «Реверта-L» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных наборов реагентов других производителей, в соответствии с инструкциями производителей наборов. После реакции обратной транскрипции готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

Полученные образцы фрагментов кДНК амплифицируют в ПЦР с использованием набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG».

7. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

7.1. Последовательность проведения этапов анализа

Общий объем реакционной смеси 30 мкл, объем кДНК-пробы – 10 мкл.

Внимание! Образцы кДНК, полученные в реакции обратной транскрипции, разбавляют равным объемом деионизованной воды (деионизованная вода не поставляется) или, в случае использования наборов «Реверта-L», ДНК-буфером, как это указано в инструкции к набору «Реверта-L» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

Порядок работы

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл в соответствии с количеством исследуемых и контрольных образцов и промаркировать.

Внимание! При использовании амплификатора планшетного типа следует избегать нанесения маркировки на крышки микропробирок.

2. Извлечь из холодильника реактивы. Встряхнуть пробирки с реагентами на вортексе и осадить капли на дно пробирки кратковременным центрифугированием.
3. Все реакционные компоненты добавлять отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0,5-10, 5-40 и 40-200 мкл.

Б. Проведение амплификации

1. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР и внести в пробирки.
 - а) В пробирке объемом 1,5 мл приготовить смесь компонентов следующего состава (из расчета на одну пробу):

Реагент-1-DENV	10 мкл
Реагент-2-DENV	10 мкл

перемешивают смесь пипетированием.
 - б) Внести по 20 мкл смеси компонентов в заранее промаркированные пробирки.
2. Внести в пробирки отдельным наконечником с аэрозольным барьером по 10 мкл препарата кДНК-пробы, предварительно полученной в реакции обратной транскрипции.

3. Поставить контрольные реакции амплификации:

- а) отрицательный контроль – вместо кДНК-пробы в пробирку внести 10 мкл ОКО-DENV.
- б) положительный контроль (вносят в последнюю очередь) – в пробирку внести 10 мкл ПКО-DENV.

Общий (конечный) объем реакционной смеси в каждой пробирке должен составить 30 мкл.

4. Поставить пробирки в ячейки амплификатора и задать программу амплификации.

а) При использовании прибора Rotor Gene 6000/3000 (Corbett Research, Австралия) или Rotor Gene Q (QIAGEN) задают следующие параметры в соответствующих диалоговых окнах:

- ротор - 36-луночный;
- объем реакционной смеси – 30 мкл;
- температурно-временные режимы:

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
95	05:00	1
95	00:10	45
52	00:20	
72	00:20	

- измерение флуоресценции при шаге 52 °C на канале JOE/HEX/R6G/Yellow;
- выполнение калибровки (оптимизации) по каналу JOE/HEX/R6G/Yellow при первом шаге детекции;
- калибровка канала JOE/HEX/R6G/Yellow от 5 Fl до 10 Fl.

После чего запускают программу амплификации и вносят данные в таблицу исследуемых образцов.

б) При использовании амплификатора планшетного типа задают следующую программу амплификации, руководствуясь инструкцией производителя прибора:

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
95	05:00	1
95	00:10	45
52	00:20	
72	00:20	

Измерение флуоресценции осуществляют при шаге 52 °C на канале JOE/HEX/R6G/Yellow;

После чего запускают программу амплификации и вносят данные в таблицу исследуемых образцов.

7.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

а) Анализ результатов при использовании амплификаторов Rotor Gene 6000/3000 (Corbett Research, Австралия) или Rotor Gene Q (QIAGEN).

Анализ результатов амплификации кДНК вируса денге проводят по каналу JOE/HEX/R6G/Yellow, для этого:

- 1) нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. JOE»/ «Cycling A. Yellow»;
- 2) отменить автоматический выбор Threshold/Порог;
- 3) в меню основного окна (Quantitationanalysis/Количественный анализ) должны быть нажаты две кнопки «Dynamictube»/«Динамический фон» и «SlopeCorrect»/«Коррекция уклона»;
- 4) в меню основного окна «Moresetting»/ «OutlierRemoval»/ «Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона — ПФ (NTC) 10 %;
- 5) в меню «CT Calculation»/ «Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог=0,05;
- 6) в таблице результатов (окно «Quant. Results»/ Количественные Результаты») появятся значения Ct.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов).

б) Анализ результатов при использовании амплификаторов планшетного типа проводят по каналу JOE/HEX/R6G/Yellow, руководствуясь инструкцией производителя к прибору. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла “Ct” в соответствующей графе в таблице результатов).

с) Результат подлежит учету в случае:

- появления пересечения кривых флуоресценции с пороговой линией на канале JOE/HEX/R6G/Yellow в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО);
- отсутствия положительного сигнала на канале JOE/HEX/R6G/Yellow в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО).

Результат считать положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имеет характерную «сигмовидную» форму и пересекает

пороговую линию. При этом значение C_t для данного образца должно быть не больше 40. Амплитуда сигнала при этом не имеет значения.

Результат считать отрицательным, если значение C_t на канале JOE/HEX/R6G/Yellow отсутствует. Если значение C_t больше 40, то ПЦР_{РВ} необходимо повторить и считать положительным в случае повторения результата или при значении C_t не больше 40.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 9398-033-05664012-2013 в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С

8.2. Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с ТУ 9398-033-05664012-2013 при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере.

8.3. Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 1 год с изготовления набора предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

8.4. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

Наборы с истекшим сроком годности, вскрытые, но не использованные наборы, а также наборы с поврежденной упаковкой, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

8.5. Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (1 год) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG» направлять на предприятие-изготовитель Федеральное бюджетное учреждение «Государственный научный

центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), 630559, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово, тел. (383) 336-60-10, факс (383) 336-74-09.

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 набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии
особо опасных инфекций
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор", к.б.н



В.А. Терновой

Зав. ОБТК ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», к.б.н.



М.П. Богрянцева

Согласовано:

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

Приложение

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ Набора реагентов для выявления кДНК вируса денге (субтипов 1-4) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG» по ТУ 9398-033-05664012-2013 на базе (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Всего было исследовано 294 пробы, содержащих кДНК вируса денге и 188 проб, не содержащих кДНК вируса денге (180 проб, содержащих гетерологичные вирусы и 8 проб, содержащих ДНК человека). Результаты приведены в таблице:

Образец	Положительные образцы*	Подтверждённые Положительные образцы	Отрицательные образцы*	Подтверждённые отрицательные образцы
Пробы, содержащие кДНК вируса денге	294	294	180 образцов, содержащих кДНК гетерологичных вирусов (вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита); 8 образцов, содержащих ДНК человека	188

*Согласно интерпретации результатов инструкции по применению «Вектор-ПЦР_{РВ}-Денге-RG»

Диагностическая чувствительность – при исследовании 294 положительных образцов, содержащих кДНК вируса денге в концентрации не менее 3×10^5 копий/мл концентрации (соответствует 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси), положительный результат в ПЦР получен для всех 294 образцов. Диагностическая чувствительность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

При этом:

при исследовании 118 положительных проб, содержащих вирус денге DENV-1 в концентрации не менее 3×10^5 копий/мл (соответствует 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси), положительный результат получен в 118 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %;

при исследовании 120 положительных проб, содержащих вирус денге DENV-2 в концентрации не менее 3×10^5 копий/мл (соответствует 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси), положительный результат получен в 120 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %;

при исследовании 28 положительных проб, содержащих вирус денге DENV-3 в концентрации не менее 3×10^5 копий/мл (соответствует 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси), положительный результат получен в 28 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 92 % с доверительной вероятностью 90 %;

при исследовании 28 положительных проб, содержащих вирус денге DENV-4 в концентрации не менее 3×10^5 копий/мл (соответствует 1×10^4 копий в 30 мкл реакционной смеси), положительный результат получен в 28 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 92 % с доверительной вероятностью 90 %.

Коэффициент вариации при оценке воспроизводимости не превышал 3 %, а при проверке повторяемости – 1,5 %.

Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 180 (2 по 90) отрицательных образцов, содержащих НК гетерологичных микроорганизмов (вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита) и 8 (2 по 4) отрицательных образцов, содержащих ДНК человека в концентрации не менее 1×10^4 копий ДНК в 30 мкл реакционной смеси, отрицательный результат в ПЦР получен для всех 188 образцов. Диагностическая специфичность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.