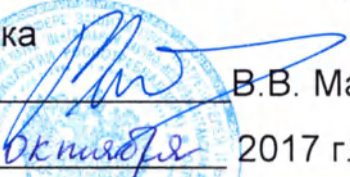


«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия
человека


В.В. Малеев

« 11 » октября 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® *Dengue virus-FL*

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	15
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	17
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	19
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	19
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)	21
СОСТАВ	21
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	21
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР	22
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	23
В. Анализ и интерпретация результатов	24
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	27
СОСТАВ	27
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	27
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР	27
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	28
В. Анализ и интерпретация результатов	29
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	32
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО ICZ-гес	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
DV	- <i>Dengue virus</i> , вирус денге
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Dengue virus*-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения РНК вируса денге (1–4 типов) в биологическом материале (плазма крови, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал (ткани мозга и внутренних органов), моча, слюна, комары (гомогенат)) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированной из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на лихорадку денге.

По литературным данным диагностическая чувствительность метода ПЦР, используемого для определения РНК вируса денге, обладает наибольшими

показателями в первую неделю заболевания и находится в диапазоне от 87 до 63%¹. Собственные данные по диагностической чувствительности набора реагентов на первой и второй неделях заболевания приведены в таблице 5.

По литературным данным² в случае исследования аутопсийного материала от людей, погибших от острой формы геморрагической или шоковой лихорадки денге, РНК вируса обнаруживается методом ПЦР (по мере убывания частоты обнаружения): в печени, селезенке, лимфатических узлах, почках, костном мозге, легких, тимусе и головном мозге.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО ICZ-rec) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО ICZ-rec с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО ICZ-rec позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-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

¹ Wright W., Pritt B. Update: The diagnosis and management of dengue virus infection in North America//Diagn Microbiol Infect Dis. 2012. – Vol.73. – P.215-220.

² Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. Clin. Microbiol. Rev. 22 (4): 564–81. doi:10.1128/CMR.00035-09.

флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация кДНК *Dengue virus*, а также амплификация последовательности кДНК ВКО ICZ-rec. Результаты амплификации кДНК *Dengue virus* и кДНК ВКО ICZ-rec регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО ICZ-rec	кДНК <i>Dengue virus</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	3'-UTR

ФОРМЫ КОМПЛЕКАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплекта:

Форма 1

Включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 2

Включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы комплекта 1 и 2 предназначены для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Производителем. Форма комплекта 1 рассчитана на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли. Форма комплекта 2 рассчитана на проведение 48 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий /мл
Плазма крови	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Комары (гомогенат)	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Моча	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Слюна	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	5000
Плазма крови	200	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	1000
	1000		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	100
Моча	1000		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	100

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

Набор реагентов обнаруживает фрагменты РНК заявленных вирусов: вируса денге 1 типа (штамм DENV-1/8/Tailand/01/2013), вируса денге 2 типа (штамм DENV-2/131/Philippines/12/2013), вируса денге 3 типа (штамм DENV-3/25/Thailand/01/2013); вируса денге 4 типа (штамм DENV-4/122/Vietnam/11/2013).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании образцов, содержащие геномную кДНК гетерологичных штаммов флавивирусов, которые могут присутствовать в исследуемых образцах и давать ложноположительные результаты на флавивирусы: WNV (*West Nile virus*, вирус

Западного Нила, ВЗН; штаммы Eg-101 и LEIV-Vlg99-27889-human), *JEV* (*Japanese encephalitis virus*, вирус японского энцефалита, ВЯЭ, штамм Накаяма), *TBEV* (*Tick-borne encephalitis virus*, вирус клещевого энцефалита, ВКЭ; штаммы Айна, Обор-4, Абсеттаров), *LGT* (*Langat virus*, вирус Лангат; штамм TP-21), *POWV* (*Powassan virus*, вирус Повассан; штамм Баерс), *USUV* (*Usutu virus*, вирус Усуту), *LIV* (*Louping ill virus*, вирус шотландского энцефаломиелита овец, ШЭО; штамм Адра-7), *OHFV* (*Omsk hemorrhagic fever virus*, вирус Омской геморрагической лихорадки, ОГЛ; штаммы Голошубин, Крутинка-73/640, Веселовка-752).

А также были исследованы образцы, содержащие кДНК/ДНК микроорганизмов, способных вызывать заболевания со сходной клинической симптоматикой, и которые могут встречаться на тех же территориях, где циркулирует вирус денге: *CCHFV* (*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки, ККГЛ; штамм IbAr10200), *CHIKV* (*Chikungunya virus*, вирус Чикунгунья, штамм *Ross late*), *Leptospira spp* (серогруппа *grippotyphosa* - штамм MV5; серогруппа *bataviae* - штамм HS26, серогруппа *sejroe* - штамм 3705), риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок (*Rickettsia sibirica* (штамм Нецветаев), *R. conorii* (штамм М-1), *R. raoultii* (Еланда 23/95, Кызыл-Орда 7/14), *R. heilongjiangensis* (штамм Приморье 25/81), *R. slovaca* (штамм Карпунино 19/69), *R. canadensis* (штамм 2678), *A.phagocytophillum* (образец из клеща *I.ricinus*), *Babesia microti* (изолят ДНК из грызунов), *Bartonella henselae* (изолят ДНК из клещей *I.persulcatus*), *Yersinia pestis* (вакцинный штамм ЕВ НИИЭГ).

Геномная ДНК человека, выделенная из плаценты, образцов плазмы крови, слюны и мочи, и образцы ДНК комаров *Aedes albopictus* были использованы для доказательства отсутствия перекрёстных реакций с ДНК-материалом пациента и комаров.

При тестировании образцов РНК штаммов вируса денге 1-4 типов во всех случаях был получен положительный результат.

При тестировании кДНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека и комаров неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об известных интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Dengue virus*-FL в сравнении с референтным методом и набором реагентов методом ПЦР

Тип образцов	Результаты исследования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® <i>Dengue virus</i> -FL		Результаты сравнения с референтным методом ³		Результаты сравнения с набором реагентов методом ПЦР ⁴	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего исследовано 179 образцов	положительных	124	0	122	2
		отрицательных	5	50	1	54
Моча	Всего исследовано 110 образцов	положительных	48	0	45	3
		отрицательных	12	50	0	62
Слюна	Всего исследовано 90 образцов	положительных	33	0	32	1
		отрицательных	7	50	0	57
Комары (гомогенат)	Всего исследовано 50 образцов	положительных	—	—	25	0
		отрицательных	—	—	0	25
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, а именно ткани мозга и внутренних органов	Всего исследовано 50 образцов	положительных	—	—	25	0
		отрицательных	—	—	0	25

Были использованы:

- Образцы плазмы крови – 179 образцов от пациентов с лихорадками различной этиологии. Для 129 образцов диагноз «лихорадка денге» подтвержден по наличию сероконверсии специфических антител к вирусу денге с использованием набора реагентов для диагностики in vitro вирусных инфекций методом непрямой иммунофлуоресценции, варианты исполнения: Mosaic Dengue virus types 1-4 IIFT (IgG), Mosaic Dengue virus types 1-4 IIFT (IgM) (EUROIMMUN AG («Евроиммун АГ»), Германия), РУ № ФСР 2010/07322.
- Моча – 110 образцов от пациентов с лихорадками различной этиологии. Для 60 образцов диагноз «лихорадка денге» подтвержден, как описано выше, а также 50 образцов мочи от пациентов с диагнозами, исключающими лихорадку денге.

³ В качестве референтного метода использовался набор реагентов для диагностики in vitro вирусных инфекций методом непрямой иммунофлуоресценции, варианты исполнения: Mosaic Dengue virus types 1-4 IIFT (IgG), Mosaic Dengue virus types 1-4 IIFT (IgM) (EUROIMMUN AG («Евроиммун АГ»), Германия), РУ № ФСР 2010/07322.

⁴ В качестве набора сравнения использовался набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ (ЗАО «Синтол», Россия), РУ № РЗН 2016/4879.

- Слюна – 90 образцов от пациентов с лихорадками различной этиологии. Для 40 образцов диагноз «лихорадка денге» подтвержден, как описано выше, а также 50 образцов мочи от пациентов с диагнозами, исключающими лихорадку денге.

В качестве набора сравнения для тех же исследуемых образцов использовался набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ (ЗАО «Синтол», Россия) РУ № РЗН 2016/4879.

Таблица 4

Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® Dengue virus-FL

Тип образцов	В сравнении с набором реагентов методом ПЦР ⁵		В сравнении с референтным методом ⁶	
	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале, %
Плазма крови	97-99	90-96	93-96	95-100
Моча	96-100	90-95	73-80	95-100
Слюна	93-100	92-98	71-83	95-100
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, а именно ткани мозга и внутренних органов	91-100	91-100	–	–
Комары (гомогенат)	91-100	91-100	–	–

Таблица 5

Диагностическая чувствительность набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® Dengue virus-FL при исследовании биологического материала в зависимости от сроков его взятия от начала заболевания

Тип образцов	В первые 7 дней заболевания			С 8-го-по 15-й день заболевания		
	Исследовано образцов	Положительные	В интервале (с доверительной вероятностью 90 %), %	Исследовано образцов	Положительные	В интервале (с доверительной вероятностью 90 %), %
Плазма крови	103	102	97-99	26	22	67-84
Моча	38	33	78-87	22	15	53-68
Слюна	25	22	74-88	15	11	53-73

⁵ Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ (ЗАО «Синтол», Россия), РУ № РЗН 2016/4879.

⁶ Набор реагентов для диагностики in vitro вирусных инфекций методом непрямой иммунофлуоресценции, варианты исполнения: Mosaic Dengue virus types 1-4 IIFT (IgG), Mosaic Dengue virus types 1-4 IIFT (IgM) (EUROIMMUN AG («Евроиммун АГ»), Германия), РУ № ФСР 2010/07322.

На первой неделе заболевания основным материалом для исследования является плазма крови, дополнительно можно исследовать мочу и/или слюну пациента, на второй неделе заболевания рекомендуется исследовать два типа исследуемого материала: плазму крови и мочу для повышения диагностической чувствительности набора реагентов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»⁷ СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные.
- Инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии с 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».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы,

⁷ В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии с 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».

оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁸, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁹. 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 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 (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных 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.

⁸ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁹ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- 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 контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- 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 безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований in vitro (например, Green-Vac[®], Shina Corporation, («Шина Корпорейшн»), Корея).
3. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

Предварительная подготовка исследуемого материала

7. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ПУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки слюны.
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. Глицерин для проведения пробоподготовки мочи.
10. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эквиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эквиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эквиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эквиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфактуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
16. Вortex (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
18. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

21. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп» (ПУ ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (ПУ ФСР 2010/07265) или другие комплекты, рекомендованные Производителем.
22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

23. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neop 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и другие рекомендованные Производителем).
24. Набор реагентов (например, «МАГНО-сорб» (ПУ ФСР 2010/07265)) и набор расходных материалов к автоматической станции.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

25. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50F:
- а) закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
 - б) 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;
 - в) 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.
26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
27. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
28. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
29. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
30. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
31. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз,

Инк.»), США) и другие, рекомендованные Производителем).

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

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

34. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма крови,
- тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал (ткани мозга и внутренних органов),
- слюна,
- моча,
- комары.

Исследуемый материал отбирается персоналом медицинского учреждения.

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса денге, должны осуществляться в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Плазма крови

Для получения образцов плазмы крови забор крови проводят утром натощак в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Не позднее 6 ч с момента взятия крови пробирку с цельной кровью центрифугируют при 800-1600 g (например, 3500-5000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 20 минут при комнатной температуре. Полученную плазму отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал (ткани мозга и внутренних органов)

Материал отбирают стерильным инструментом (например, пинцет) в стерильный пластиковый контейнер объемом 50 мл с плотно закрывающейся крышкой или пробирку объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала (тканей мозга и внутренних органов):

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный контейнер объемом 50-60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов. Если нет возможности исследовать материал в течение 1 суток после забора, то необходимо провести предобработку материала.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток.

Не допускается замораживание материала!

Слюна

Перед получением слюны проводят трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С — в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Комары

Собранный материал разбирают в лаборатории по видам, полу, местам и датам сбора и помещают в сухие чистые пробирки объемом 2,0 мл. При объединении комаров в пулы число особей в одном пуле не должно превышать 50.

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С или в сосуде Дюара с жидким азотом – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы плазмы крови, а также образцы прозрачной мочи не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки, если на исследование предоставлены образцы мутной мочи. В этом случае в пробирки объемом 1,5 мл отобрать по 1200 мкл мочи. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. 100 мкл полученной осветленной мочи используют для экстракции РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» или 1000 мкл осветленной мочи используют для экстракции РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб». Если материал будет исследован позже, чем через 1 сутки после забора, необходимо перенести по 1100 мкл мочи в несколько пробирок объемом 1,5 мл. Если предполагается экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп», в пробирки с 1100 мкл мочи внести глицерин в объеме 10 % от объема пробы (120 мкл), перемешать на вортексе для равномерного распределения глицерина. Если предполагается экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб», глицерин в мочу не вносить, моча замораживается без глицерина.

Допускается хранение образцов материала с глицерином и без глицерина:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала (тканей мозга и внутренних органов) требуют предварительной подготовки. Для экстракции РНК берут 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлажденных стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани готовят 10% суспензию на охлажденном стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для этого на 1 объем растёртой ткани добавляют 9 объемов физиологического раствора или фосфатного буфера. 100 мкл полученной суспензии используют для экстракции РНК.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов биопсийного материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Комары требуют предварительной подготовки.

Предварительно формируют пулы комаров (не более 50 особей). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 30 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Для приготовления суспензий комаров используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора (например, Tissue Lyser LT) применяют следующие параметры для гомогенизации комаров: диаметр шариков – 5 мм, частота – 50 Гц/с, время гомогенизации 5 мин, объем буфера 700 мкл (пул из 25 комаров), объем буфера 1500 мкл (пул из 50 комаров).

Допускается хранение предварительно обработанных комаров до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы слюны требуют предварительной подготовки. Перед экстракцией нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение слюны, используя реагент «МУКОЛИЗИН». В емкость со слюной добавляют «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:3 (1 часть слюны к 3 частям «МУКОЛИЗИНА»), ориентируясь по градуировке емкости. В случае, если слюна очень густая, проводят ее разжижение реагентом «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:5. В процессе разжижения слюны (10 минут) емкость периодически встряхивают на вортексе. Для экстракции РНК используют 100 мкл разжиженной слюны.

Допускается хранение предварительно разжиженной слюны до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования непригодны образцы плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта. Гепарин является ингибитором ПЦР («МУ 1.2.2741-10. 1.2. Гигиена, токсикология, санитария. Порядок отбора проб для

выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных. Методические указания»).

Сведения о других интерферирующих веществах при условии соблюдения правил взятия и предварительной подготовки исследуемого материалах, указанных в инструкции, отсутствуют.

Для снижения риска получения ложноотрицательного результата из-за наличия в пробе интерферирующих веществ в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО ICZ-rec), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО ICZ-rec, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

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».

Для экстракции РНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции РНК из плазмы крови, тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала (тканей мозга и внутренних органов), мочи, слюны, комаров в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК из плазмы крови, мочи в соответствии с инструкцией и методическими рекомендациями к используемому комплекту реагентов.

Объемы реагентов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО ICZ-rec

Объем ВКО ICZ-rec – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО DV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» для 200 мкл образца:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec**.

Объем **ВКО ICZ-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **190 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО DV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объем элюции – **100 мкл** (при использовании автоматических станций для экстракции РНК).

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» для 1000 мкл образца:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec**.

Объем **ВКО ICZ-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **1000 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **1000 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **990 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО DV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объем элюции – **100 мкл** (при использовании автоматических станций для экстракции РНК).

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели и при температуре не выше минус 68 °С до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента гДНК *Dengue virus* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL DV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
K+ DV / ICZ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО DV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	7 пробирок

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

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

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

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку Rnase-free, Dnase-free.

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР 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 пробирок для ОТ-ПЦР

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 DV, 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,5 мкл полимеразы (TaqF), 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv), 0,25 мкл RT-G-mix-2. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL DV. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL DV, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMIv), RT-G-mix-2, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

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

7. Поставить контрольные реакции.
 - а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K+ DV / ICZ.
 - б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (K-)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K-.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО DV**.

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 ОТ-ПЦР 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. 6, 7)¹⁰.

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного¹¹ и планшетного¹² 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	10 с	—	45
	60	20 с	FAM, JOE	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

Таблица 7

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁰ и планшетного¹¹ 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	10 с	—	45
	60	30 с	FAM, JOE	

¹⁰ Используйте программу амплификации в таблице 7, если нет необходимости использовать единую программу амплификации.

¹¹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹² Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки 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

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	«ДНК ВКО ICZ-rec	«ДНК <i>Dengue virus</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)		Результат
FAM	JOE	
Определено меньше граничного	Отсутствует	РНК <i>Dengue virus</i> НЕ обнаружена
Определено или отсутствует*	Определено меньше граничного	РНК <i>Dengue virus</i> Обнаружена
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**
Определено меньше граничного	Определено больше граничного	Сомнительный***

* Отсутствие сигнала по каналу для флуорофора FAM не существенно, если РНК *Dengue virus* обнаружена.

** 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 ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	определено меньше граничного	определено меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	определено меньше граничного	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). 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, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, 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 (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента гДНК *Dengue virus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь DV-Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
К+ DV/ICZ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО DV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	7 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

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

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку Rnase-free, Dnase-free.

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

А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью DV-Lyo для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов

реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

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

3. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ DV / ICZ**.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО DV**.

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. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ОТ-ПЦР 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.11, 12)¹³.

Таблица 11

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного¹⁴ и планшетного¹⁵ 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	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

¹³ Используйте программу амплификации в таблице 12, если нет необходимости использовать единую программу амплификации.

¹⁴ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁵ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

Таблица 12

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹³ и планшетного¹⁴ 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	10 с	–	45
	60	30 с	FAM, JOE	

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

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

Таблица 13

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	κДНК ВКО ICZ-rec	κДНК <i>Dengue virus</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
Определено меньше граничного	Отсутствует	РНК <i>Dengue virus</i> НЕ обнаружена
Определено или отсутствует*	<u>Определено</u> меньше граничного	РНК <i>Dengue virus</i> Обнаружена
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный**
Определено меньше граничного	Определено больше граничного	Сомнительный***

* Отсутствие сигнала по каналу для флуорофора FAM не существенно, если РНК *Dengue virus* обнаружена.

** 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 Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 15 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 15

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). 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, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, 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 (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукладывать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL DV, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMLv), RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL DV хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь DV-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель 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.

Рекламации на качество набора реагентов направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹⁶.

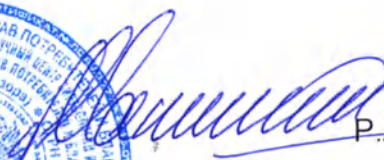
При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и

¹⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



Р.А. Максютов

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Код партии



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Дата изменения



Температурный
диапазон



Изготовитель



Содержимого
достаточно для
проведения п-
количества тестов



Использовать до



Обратитесь к
инструкции по
применению



Не допускать
воздействия
солнечного света



Дата изготовления



Беречь от влаги

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 34 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.В. Малеев



**ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
ВКЛАДЫШ**

**К набору реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® Dengue virus-FL
«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L**

Форма 1: **REF** R239(1); Форма 2: **REF** R239(2)Ly

LOT 16.05.17

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate / Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	More Settings/ Outlier Removal/Устранение выбросов	Slope Correct / Коррект. уклона	Threshold / Порог	Eliminate Cycles before / Исключить циклы
FAM/Green	от 5FI до 10FI	5 %	включена	0,03	5
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	5 %	включена	0,03	5

Примечание – В том случае, если кривые флуоресценции по каналу FAM и JOE не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона - ПФ) равным **10 %**.

Граничные значения порогового цикла Ct

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
K+	< 32	< 32
OK	< 30	отсутствует
ПК	< 30	< 32
K-	отсутствует	отсутствует
Исследуемые образцы	< 32	< 42

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

В программе амплификации для каждого шага этапа циклирования задать скорость нагревания/охлаждения Ramp Rate 2,5 °C/sec (функция Step Options)

Канал	Threshold/Порог
FAM	Установить пороговую линию на уровне 10% от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации.
HEX	Установить пороговую линию на уровне 5 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации.

Примечание - кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

«ДТ-96»

Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница / порог положительного результата	Верхняя граница / порог нормализации данных
Fam, Hex	90 %	10 StD	10 % F(Cp)	10 % F(Cp)

Канал	Threshold/Порог
Fam	Установить пороговую линию на уровне 5% от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации.
Hex	Установить пороговую линию на уровне 3 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации.

Примечание - кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Граничные значения порогового цикла Ct для приборов планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора	
	FAM	JOE
K+	< 36	< 36
OK	< 33	отсутствует
ПК	< 33	< 36
K-	отсутствует	отсутствует
Исследуемые образцы	< 36	< 43



**ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека**

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495) 974-96-46, факс : (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набора реагентов для диагностики in vitro
АмплиСенс® Dengue virus-FL**

Форма 1	LOT 16.05.17	 2017-05-16
		 2018-05-16

ТУ 9398-239-01897593-2016.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Разведение СОП ПКО DV-rec до концентрации 5×10^3 копий/мл	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Разведение СОП ПКО DV-rec до концентрации 1×10^3 копий/мл	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Разведение СОП ПКО DV-rec до концентрации 50 копий/мл	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение C_t по каналу для флуорофора JOE определено менее граничного или отсутствует	соответствует
ПКО DV	Определены значения C_t менее граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
OK	Отсутствует значение C_t по каналу для флуорофора JOE, определено значение C_t , менее граничного по каналу для флуорофора FAM	соответствует
K-	Отсутствуют значения C_t по всем каналам детекции	соответствует
K+ (K+ DV / ICZ)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL DV	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ПЦР-смесь DV-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K+ DV / ICZ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПКО DV	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Форма 1: **REF** R239(1); Форма 2: **REF** R239(2)Ly

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL DV, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv), RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL DV хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь DV-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

16.05.17

Руководитель

ГРУППА
КОНТРОЛЯ
КАЧЕСТВА
(подпись)

(Наумкина Е.М.)
(Ф.И.О.)



Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 2 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В. Малеев



**ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495) 974-96-46, факс : (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набора реагентов для диагностики in vitro
АмплиСенс® Dengue virus-FL**

Форма 2	LOT 16.05.17	 2017-05-16
		 2018-05-16

ТУ 9398-239-01897593-2016.

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Разведение СОП ПКО DV-rec до концентрации 5×10^3 копий/мл	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Разведение СОП ПКО DV-rec до концентрации 1×10^3 копий/мл	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
Разведение СОП ПКО DV-rec до концентрации 50 копий/мл	Определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение C_t по каналу для флуорофора JOE определено менее граничного или отсутствует	соответствует
ПКО DV	Определены значения C_t менее граничного по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует
OK	Отсутствует значение C_t по каналу для флуорофора JOE, определено значение C_t , менее граничного по каналу для флуорофора FAM	соответствует
K-	Отсутствуют значения C_t по всем каналам детекции	соответствует
K+ (K+ DV / ICZ)	Определены значения C_t менее граничных по каналам для флуорофоров FAM и JOE	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL DV	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ПЦР-смесь DV-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K+ DV / ICZ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ПКО DV	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Форма 1: REF R239(1); **Форма 2:** REF R239(2)Ly

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL DV, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Реввертазу (MMIv), RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL DV хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь DV-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

16.05.17

Руководитель

ГРУППА
КОНТРОЛЯ
КАЧЕСТВА
(подпись)

(Наумкина Е.М.)
(Ф.И.О.)



Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 2 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В.Малеев

