

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель _____ директора
Федерального _____ бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» _____ Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора)



В.В. Малеев

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® FiloA-скрин-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 5

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ..... 6

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... 8

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА . 10

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК 10

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..... 11

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... 11

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 11

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L) 13

 СОСТАВ..... 13

 РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК С
 ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 13

 А. Подготовка пробирок для проведения ОТ-ПЦР 13

 Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» 14

 В. Анализ и интерпретация результатов 15

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 18

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 19

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- 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
EBOV Zaire	- вирус Эбола, вариант Заир
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
MARV	- вирус Марбург
SUDV	- вирус Эбола, вариант Судан

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® FiloA-скрин-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения РНК вируса Эбола вариант Заир (EBOV Zaire), РНК вируса Эбола вариант Судан (SUDV) и РНК вируса Марбург (MARV), принадлежащих к семейству *Filoviridae*, в биологическом материале, полученном от человека (цельная кровь либо её компоненты: лейкоциты и плазма) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные 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 геморрагические лихорадки, вызванные филовирусами, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускается только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемых вирусов и кДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL 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 Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 4 реакции – амплификация кДНК *EBOV Zaire*, кДНК *SUDV*, кДНК *MARV*, а также амплификация последовательности кДНК ВКО-FL. Результаты амплификации кДНК *EBOV Zaire*, кДНК *SUDV*, кДНК *MARV*, а также кДНК ВКО-FL регистрируются по 4-м различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
кДНК-мишень	кДНК EBOV Zaire	кДНК SUDV	кДНК MARV	кДНК BKO-FL
Область амплификации	Polymerase	Transcription Factor	Nucleoprotein	искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 1 рассчитана на проведение 96 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 исследуемого образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для обратной транскрипции, амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Цельная кровь либо её компоненты	100	«РИБО-золь-В», «РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-L	10 ³
	100	QIAGEN QIAamp MinElute Virus kit		

Данный достигается предел обнаружения 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. Для подтверждения аналитической специфичности набора реагентов были исследованы образцы, содержащие геномную ДНК/РНК вирусов/микроорганизмов, способных вызывать заболевания, схожие по клиническим проявлениям с филовирусными лихорадками:

- Буньявирусы (сем. Bunyaviridae): CCHFV.

- Флавивирусы (сем. *Flaviviridae*): *Yellow fever virus*, *Dengue virus*, *WNV*, *TBE*, *JEV*.
- Тогавирусы (сем. *Togaviridae*): *Chikungunya virus*.
- Рабдовирусы (сем. *Rhabdoviridae*): *Rabies virus*.
- ДНК риккетсий (*R. prowazekii*, *R. canadensis*, *R. sibirica*).

А также были исследованы образцы, содержащие ДНК/РНК вирусов, вызывающие острые и хронические инфекции, которые могут присутствовать в исследуемых образцах и давать ложноположительные результаты на филовирусы:

- Флавивирусы (сем. *Flaviviridae*): *HCV*.
- Ретровирусы (сем. *Retroviridae*): *HIV*.
- Гепаднавирусы (сем. *Hepadnaviridae*): *HBV*.

Геномная ДНК человека была использована для доказательства отсутствия перекрёстных реакций с ДНК-материалом пациента.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было. Информация об известных интерферирующих соединениях указана в разделе. «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

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 работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», 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» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать 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 односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

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.

- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13–«Безопасность работы с

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

2. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 и 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Заворачивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или

аналогичные).

5. Штативы для пробирок объемом 1,5 и 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
7. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

11. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-золь-В» (ПУ № ФСР 2008/03151), «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147), QIAGEN QIAamp MinElute Virus kit или другие комплекты, рекомендованные Производителем.
12. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
16. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
18. Программируемый амплификатор роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия).
19. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
20. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
21. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы цельной крови либо её компонентов.

Взятие цельной периферической крови у людей проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА в соотношении 1:20. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (В противном случае кровь свернется и экстракция РНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив. Экстракцию РНК проводить из 100 мкл цельной крови (в случае экстракции из 200 мкл – объём до 200 мкл доводится ОКО).

Допускается хранение образцов крови до ПЦР-исследования или проведения предобработки:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 часов.

Недопустимо замораживание образца цельной крови!

В случае необходимости провести исследование компонентов крови – лейкоцитов и плазмы, следует осуществить дополнительную пробоподготовку (см. раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК»).

Подготовку образцов провести не позднее указанного выше времени.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 часов.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы цельной крови не требуют предварительной подготовки.

Для получения лейкоцитов и плазмы крови требуется предварительная подготовка образцов крови.

Перенести 1,5 мл крови с раствором ЭДТА, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 2,0 мл. Центрифугировать 10 минут при 40 g (например, 800 об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Не захватывая осадок эритроцитов, перенести 500-600 мкл супернатанта (плазмы с лейкоцитами) отдельным наконечником с фильтром в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл.

Супернатант, содержащий плазму и лейкоциты, можно использовать для проведения процедуры экстракции РНК из 100 мкл (в случае экстракции из 200 мкл – объём до 200 мкл доводится ОКО).

Для разделения плазмы и лейкоцитов необходимо пробирки с отобранным

супернатантом отцентрифугировать 5 мин при 7 тыс g (например, 10 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Нижняя фракция содержит лейкоциты крови, верхняя фракция содержит плазму крови. Экстракцию РНК проводить из 100 мкл суспензии лейкоцитов крови или из 100 мкл плазмы (в случае экстракции из 200 мкл – объем до 200 мкл доводится ОКО).

Допускается хранение плазмы и/или лейкоцитов крови (осадка) 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.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции РНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

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 используются комплекты реагентов для экстракции РНК –

«РИБО-золь-В», «РИБО-преп», QIAGEN QIAamp MinElute Virus kit и другие комплекты, рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектом реагентов смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-В»

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

Объем **ВКО-FL** – **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 FiloA**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов QIAGEN QIAamp MinElute Virus kit:

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

Объем **ВКО-FL** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем образца для экстракции – **200 мкл (100 мкл исследуемого материала и 100 мкл ОКО)**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **190 мкл ОКО**.

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

Объем элюции – **50 мкл**.

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-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК вируса Эбола, вариант Заир (*EBOV Zaire*), РНК вируса Эбола, вариант Судан (*SUDV*) и РНК вируса Марбург (*MARV*) 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 FiloA-Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
K+ FiloA	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО FiloA	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
BKO-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК 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 проведения ОТ-ПЦР

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью FiloA-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! 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+ Filo A**.
 - б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К–)** – внести в пробирку **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 Filo A**

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. 3).

Таблица 3

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
для приборов роторного² 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	–	42
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

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

² Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

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 4-м каналам (см. табл.4):

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	кДНК EBOV Zaire	кДНК SUDV	кДНК MARV	кДНК ВКО-FL

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 (см. табл.5):

Таблица 5

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	РНК EBOV Zaire, SUDV и MARV НЕ обнаружена
определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	определено или отсутствует	РНК EBOV Zaire обнаружена
отсутствует	определено меньше граничного	отсутствует	определено или отсутствует	РНК SUDV обнаружена
отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	определено или отсутствует	РНК MARV обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

*В случае получения невалидного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК. Рекомендуется, по возможности, произвести повторное взятие исследуемого материала.

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. 6 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируе-мый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
ПК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл.6) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК)
 - а) По какому-либо из каналов для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами 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.

- б) По каналу для флуорофора Cy5 значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что образец ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование 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 и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами 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-L при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь FiloA-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света и влаги месте.

Холодильная камера должна 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 по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru)³.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого
достаточно для
проведения п-
количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие
для диагностики *in vitro*



Обратитесь к
инструкции по
применению



Дата изменения



Не допускать
воздействия
солнечного света



Температурный
диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 20 лист об

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора




В.В. Малеев