

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»



А.Кузубов

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации РНК
вирусов Эбола и Марбург методом полимеразной цепной реакции
в реальном времени (ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ)
по ТУ 939816-004-46395995-2013»

2013

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов Эбола и Марбург методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ) по ТУ 939816-004-46395995-2013».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) РНК вирусов Эбола и Марбург в пробах объектов окружающей среды, воздуха, в пробах из клинических образцов, в вируссодержащей суспензии, в биопсийном и аутопсийном материале.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфических патологий (геморрагических лихорадок Эбола и Марбург) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА), в объектах окружающей среды; как ускоренного предварительного теста при выполнении культурального и биологического методов исследования и идентификации подозрительных культур; для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика геморрагических лихорадок Эбола и Марбург, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, вирусологических лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, в эпидемиологических службах для расшифровки вспышек экзотических инфекций, а также в стационарных и мобильных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства обороны.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 5 реагентов.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ЭМ	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-ЭМ	сухое вещество белого цвета	2 мг	3 пробирки
4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	сухое вещество белого цвета	2 мг	1 пробирка

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, **РС-ЭМ**, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимольная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, восемь олигонуклеотидных праймеров, восемь флуоресцентных зондов, фермент Taq ДНК-полимераза; фермент MMLV-ревертаза; синтетическая РНК **ВПК**, трегалоза.

Разбавитель, **РБ**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ПЦР-буфер; хлорид магния; глицерол; вода для ПЦР.

Раствор для разбавления ПКО, **ОКО**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ТЕ буфер.

Положительный контрольный образец, **ПКО-ЭМ**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь синтетиче-

ских РНК, полученных с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантных плазмид рGem-T с встроенными специфическими фрагментами НК гена нуклеопротеина генома вируса Эбола и гена нуклеопротеина генома вируса Марбург.

Внутренний положительный контроль выделения, **ВПК-В-РНК**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: синтетическая РНК, полученная с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантной плазмиды рGem-T со встроенным специфическим фрагментом ДНК.

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 60 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 48 определений.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей опасных вирусных инфекций основано на использовании метода мультиплексной одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) в одной микропробирке.

В основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) лежит изменение сигнала флуоресценции в ходе реакции. Это изменение происходит благодаря использованию специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда, который, подобно праймеру, в ходе реакции связывается с одной из цепей ампликона. К 5' и 3' концам к зонда присоединены флуорофор и гаситель флуоресценции соответственно. При возбуждении молекулы флуорофора светом определенной длины волны данная молекула испускает свет другой длины волны. За счет близости молекул флуорофора и гасителя флуоресценции, находящихся на одном зонде,

последний поглощает флуоресценцию и изменения аналитического сигнала не происходит. В результате расщепления специфического для искомой ДНК олигонуклеотидного зонда Таq-полимеразой на этапе элонгации при температурах около 60 °С, гаситель прекращает поглощать флуоресценцию данной молекулы флуорофора (технология TaqMan). С каждым циклом ПЦР число освобожденных молекул флуорофора экспоненциально возрастает (рисунок 1).

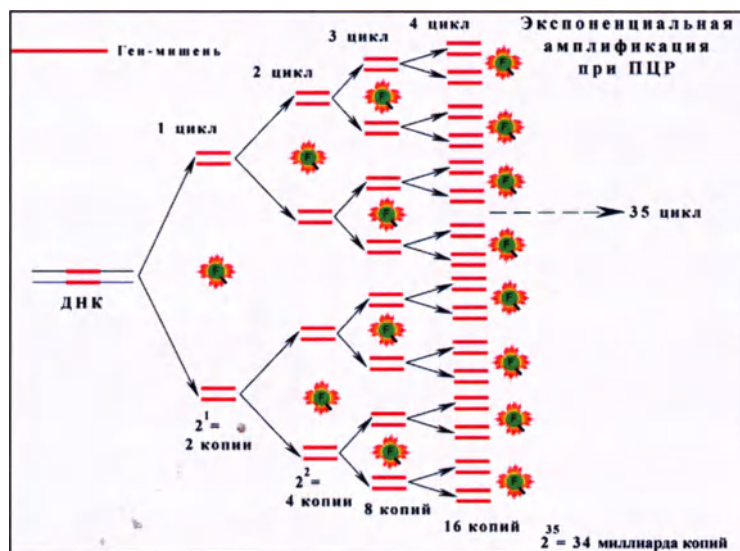


Рисунок 1 – Принцип аналитического процесса

Постановка ОТ-ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32М (48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (BioRad, США), или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

При амплификации с помощью ОТ-ПЦР-РВ используют два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена нуклеопротеина вируса Эбола, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена нуклеопротеина вируса Марбург, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих нуклеиновые кислоты (НК) внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих НК внутреннего положительного контроля выделения, а также восемь флуоресцентных зондов. Процесс амплификации специфичных фрагментов

закljučается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ» реализует преимущества мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в части одновременного выявления в одной пробе РНК двух вирусов, а также двух контролей анализа по разным каналам детекции флуоресценции.

Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: FAM – вирус Эбола Рестон; R6G – вирус Марбург; ROX – вирус Эбола Заир, Судан, Бондибуджо, Тай Форест; Cy5 – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ; Cy5.5 – внутренний положительный контроль выделения РНК

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК вирусов Эбола и/или Марбург. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вирусов Эбола и/или Марбург.

2.3 Ограничения метода

В инфицированном материале РНК вирусов может быть не обнаружена по причине ингибирования ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения нуклеиновых кислот.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения НК либо проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ОТ-ПЦР-РВ (п. 8.3 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутренних положительных контрольных образцов выделения РНК (ВПК-В-РНК) и ОТ-ПЦР-РВ (ВПК) (п. 8.3 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность анализа – 100 %, определяется используемыми праймерами и флуоресцентными зондами, строго специфичными в отношении уникальных фрагментов геномов – гена нуклеопротеина генома вируса Эбола и гена нуклеопротеина генома вируса Марбург. Набор реагентов выявляет только нуклеиновые кислоты данных вирусов. В образцах, не содержащих НК указанных микроорганизмов, результат исследования должен быть отрицательным.

Аналитическая специфичность изучена на музейных штаммах вирусов Марбург, Эбола, Ласса, Мачупо, Хунин, ВЭЛ, клещевого и японского энцефалитов, денге, желтой лихорадки, ККГЛ, ТОРС; бактериях *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetti*.

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, клещей, комаров и грызунов ложноположительных результатов не выявлено.

3.2 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора реагентов – не более $1,0 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов в одном миллилитре пробы ($\text{ГЭ} \cdot \text{мл}^{-1}$). Аналитическая чувствительность, определяемая биологическим (вирусологическим) методом – не более $1,0 \cdot 10^3$ условных единиц в одном миллилитре пробы ($\text{УЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$). Данные показатели достигаются при использовании для выделения НК набора «М-Сорб-Туб» (Рег. № ФСР2010107635, ЗАО «Синтол», г.Москва).

Допускается использование зарегистрированных аналогов других производителей, при условии объема аликвоты исходного материала (пробы) не менее 100 мкл и принципа выделения, основанного на нуклеосорбции на твердом носителе (магнитных частицах либо SiO_2).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I-II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

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

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

Спецификации по безопасности предоставляются по запросу.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних элек-

трических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}}$ (№1 – 490нм/520нм, №2 – 525нм/550нм, №3 – 550нм/580нм, №4 – 630нм/665нм, №5 – 675нм/694нм), например, «АНК-32М (48)», CFX-96.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

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

штатив-карусель для данных пипеток.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);
микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);
штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ЗАО Синтол);
холодильник на 2-8 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;
одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
ТЕ-буфер (кат. номер В-014, ЗАО «Синтол»);
отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: объектов окружающей среды, воздуха, образцов цельной крови, сыворотки и/или плазмы крови, лейкоцитарной фракции крови, СМЖ и проб секционного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусами Эбола и Марбург проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.1285-03) и методических указаний «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации

нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09). Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ забор проб крови проводят в ранние сроки болезни (в период вирусемии).

Пробы воздуха (биологического аэрозоля) отбирают с помощью специальных приборов, снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 2 м³.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения НК из проб различного происхождения используют набор «М-сорб-Туб». Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ».

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (**ОКО-В**), который потом обязательно анализируется в ОТ-ПЦР-РВ. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения НК.

При применении на этапе пробоподготовки набора «М-сорб-Туб» добавления **ВПК-В-РНК** для контроля выделения нуклеиновых кислот не требуется, поскольку он входит в состав лизирующего компонента. При применении других наборов используют пробирку с **ВПК-В-РНК** из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ». Сухое содержимое **ВПК-В-РНК** разводят 200 мкл элюента из состава наборов реагентов для выделения и 10 мкл полученного раствора добавляют в пробирку с пробой непосредственно перед внесением сорбента. Регистрация роста сигнала по каналу **Sy5.5** свидетельствует об успешном выделении РНК.

В случае использования аналогичных наборов других производителей, ЗАО «Синтол» не несет ответственности за показатель аналитической чувствительности набора реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ».

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Пробы объектов окружающей среды, плазму и сыворотку крови хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С не более одного месяца, при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года, не допуская его оттаивания до проведения исследования. Образцы тканей хранят при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года.

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

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителей геморрагических лихорадок Эбола и Марбург, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.1285-03) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал, выделенные НК, утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления контрольных образцов

В пробирку с сухим содержимым **ПКО-ЭМ** добавляют 200 мкл **ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов **ПКО-ЭМ** допускается при температуре не выше минус 20 °С не более месяца.

7.2 Разведение препарата РНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации РНК вирусов Эбола и Марбург необходимо внести в реакцию 20 мкл препарата РНК. В случае необходимости, раствор препарата РНК разводят с помощью ТЕ-буфера (кат. номер В-014, ЗАО «Синтол»).

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

- одна микропробирка с **РС-ЭМ**;
- 15 мкл **РБ**.

На каждый анализ расходуются:

- 20 мкл **ПКО-ЭМ**;
- 20 мкл **ОКО**.

8.2 Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводится в один этап:

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;
- вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 1 и вводят красители **FAM, R6G, ROX, Cy5** и **Cy5.5**;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50 °С – 900 секунд	1
2	95 °С – 300 секунд	1
3	60 °С – 40 секунд	50
4	95 °С – 15 секунд	

- вводят сведения об образцах по всем красителям и активируют прибор в соответствии с руководством по эксплуатации;

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

- набор реагентов извлекают из холодильника, **РБ** и **ОКО** перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;

- помещают микропробирки в стрипах (**РС-ЭМ**) в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки; открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл **РБ**;

- используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в микропробирки соответственно порядку исследования образцов по 20 мкл **ОКО**, **ОКО-В** и далее по 20 мкл растворов исследуемых образцов в необходимой повторности*;

- закрывают крышки микропробирок;

- вносят в микропробирки соответственно маркировке по 20 мкл **ПКО-ЭМ**;

- закрывают крышки микропробирок;

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования (таблица 2) и прикрывают крышки микропробирок;

Таблица 2 - Порядок исследования образцов

<i>№ ячейки</i>	<i>Образец</i>
1	ПКО-ЭМ
2	ПКО-ЭМ
3	ОКО
4	ОКО
5	ОКО-В
6	ОКО-В
7	исследуемый образец 1
8	исследуемый образец 1
9	исследуемый образец 2
10	исследуемый образец 2
11	

- закрывают крышку прибора, запускают реакцию ОТ-ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора, расчетное время анализа составляет в среднем 2 часа.

*Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях, особенно в случае анализа нативных проб (без биологического обогащения).

8.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)», CFX-96 или эквивалентные им (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции (регистрация роста сигнала) означает любую величину порогового цикла C_t менее 50. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается программой прибора, например, как величина порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах АНК), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы BioRad) и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **FAM**, **R6G** либо **ROX** относительно отрицательного контроля означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов НК вирусов Эбола или Марбург в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в случае отсутствия положительной динамики по каналам **FAM**, **R6G** и **ROX** означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном прохождении реакций ОТ и ПЦР-РВ, и подтверждает отсутствие специфических фрагментов НК вирусов Эбола и Марбург в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5.5** в случае отсутствия положительной динамики по каналам **FAM**, **R6G** и **ROX** означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, и дополнительно подтверждает отсутствие специфических фрагментов НК вирусов Эбола и Марбург в данной микропробирке.

Учет результатов анализа (толкование характера реакций)

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала **ОКО** по каналам **FAM**, **R6G** или **ROX** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла **Ct** при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО-ЭМ** по каналам **FAM**, **R6G** или **ROX** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала по каналу **Cy5*** (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ОКО** по каналам **FAM**, **R6G** и **ROX**;
- в случае регистрации роста сигнала по каналу **Cy5***, с любой величиной порогового цикла **Ct**;
- в случае регистрации роста сигнала **ПКО-ЭМ** по каналам **FAM**, **R6G** и **ROX**, с любой величиной порогового цикла **Ct**.

Регистрация роста сигнала по каналу **FAM** в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома

вируса Эбола Рестон. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала по каналу **R6G** в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома вируса Марбург. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала по каналу **ROX** в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома вируса Эбола Заир, Судан, Бондибуджо либо Тай Форест. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала по каналу **Cy5*** с пороговым циклом C_t менее 37,0 свидетельствует об успешном прохождении обратной транскрипции и ПЦР-РВ в каждой конкретной микропробирке, большие значения C_t свидетельствуют о некотором ингибировании ОТ-ПЦР-РВ.

В случае применения набора «М-сорб-Туб» либо добавления **ВПК-В-РНК** при применении других наборов:

- регистрация роста сигнала по каналу **Cy5.5** с пороговым циклом менее 37,0, свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, большие значения C_t свидетельствуют о некоторых потерях на этапе выделения РНК.

* Примечание: в пробирках, имеющих регистрацию роста сигнала по каналам **FAM**, **R6G** или **ROX** с пороговым циклом реакции менее 30,0, допускается отсутствие регистрации роста сигнала либо низкая амплитуда кинетической кривой по каналам **Cy5** и **Cy5.5**.

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Интерпретация результатов анализа проб с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ»

Результат ПЦР по каналу					Образец	Интерпретация
FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев						
-	-	-	-	-	ПКО	Ложноотрицательный результат , ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
+	любой	любой	любой		ОКО-В	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК
любой	+					
	любой	+			ОКО	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ОТ-ПЦР-РВ
+	любой	любой				
любой	+				любой	
любой	любой	+				
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы						
-	-	-	-	-	проба	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
-	-	-	-	.*		Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов						
+	+	+	любой		ПКО	Набор реагентов специфичен в отношении НК вирусов Эбола и Марбург
-	-	-	+	+*	ОКО-В	Контаминация отсутствует
-	-	-	+	-	ОКО	
-	-	-	-	+*	проба	В пробе не обнаружены НК вирусов Эбола и Марбург
+	любой		любой			В пробе присутствуют НК вируса Эбола Рестон
любой	+	любой				В пробе присутствуют НК вируса Марбург
любой		+				В пробе присутствуют НК вируса Эбола Бондибуджо, Тай Форест, Заир или Судан
Примечание: в случае использования набора М-Сорб-Туб, либо добавления ВПК-В-РНК при использовании других наборов						

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем амплификатора. Работу с программой осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 939816-004-46395995-2013 - в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 939816-004-46395995-2013 всеми видами крытого транспорта при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до плюс 20 °С.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Срок годности разведенных препаратов **ПКО-ЭМ** и **ВПК-В-РНК** не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные компоненты набора, пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе утилизируют по классу Б, как эпидемиологически опасные отходы (СанПиН 2.1.7.2790-10).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

10.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ» направлять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495) 984-69-93, факс. (499) 977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 20 листов

Генеральный директор
ЗАО "Синтол"



А.В. Кузубов