

СИНТОЛ

г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, к. 352
Тел/факс: (495) 977-7455 Тел.: (495) 984-69-93
e-mail: syntol@iab.ac.ru www.syntol.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

«ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ»

«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ РНК ВИРУСОВ ДЕНГЕ И ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)»

Серия _____ Наборов в серии _____ шт. Дата изготовления _____

Пункт ТУ	Наименование показателя	Требования ТУ 9398-002-46395995-2013	Результаты контроля (соответствует/не соответствует/значение полученной величины (по применимости))
1.3	Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 6 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, две пробирки объемом 1,5 мл, четыре пробирки объемом 0,5 мл	Соответствует Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 6 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, две пробирки объемом 1,5 мл, четыре пробирки объемом 0,5 мл
1.5, 1.6	Упаковка и маркировка	Полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), 0,5 и 1,5 мл (с резьбовой крышкой), пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги	Соответствует Полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), 0,5 и 1,5 мл (с резьбовой крышкой), пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги
1.2, табл. 1, п. 1, 2	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-денге/ЖЛ*	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Разбавитель, РБ**	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,8	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Положительный контрольный образец, ПКО-денге/ЖЛ	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
1.2, табл. 1, п. 3	Положительный результат ОТ-ПЦР-РВ.	Регистрация роста сигнала с любой величиной порогового цикла Ct в пробирках с ПКО-денге/ЖЛ по каналам R6G и ROX. Регистрация роста сигнала с Ct менее 37,0 в пробирках с ПКО-денге/ЖЛ по каналам FAM и Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала в пробирках с ПКО-денге/ЖЛ по каналам R6G и ROX. Зарегистрирован рост сигнала в пробирках с ПКО-денге/ЖЛ по каналам FAM и Cy5 с Ct менее 37,0
	Отрицательный результат ОТ-ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с Ct менее 37,0 в пробирках с ОКО по каналам FAM и Cy5. Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО по каналам R6G и ROX	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала в пробирках с ОКО по каналам FAM и Cy5 с Ct менее 37,0. Не зарегистрирован рост сигнала в пробирках с ОКО по каналам R6G и ROX
	Аналитическая чувствительность	Регистрация роста сигнала с любой величиной порогового цикла Ct в пробирках с СКО-ЖЛ по каналу ROX; СКО-Денге по каналу R6G. Регистрация роста сигнала с Ct менее 37,0 во всех пробирках по каналам FAM и Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала в пробирках с СКО-ЖЛ по каналу ROX; СКО-Денге по каналу R6G. Зарегистрирован рост сигнала во всех пробирках по каналам FAM и Cy5 с Ct менее 37,0

Примечания:

*Содержит дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, специфические праймеры, флуоресцентные зонды, Taq-полимеразу, MMLV-ревертазу, РНК внутреннего положительного контроля, трегалозу для проведения ОТ-ПЦР-РВ.

**Содержит ПЦР буфер (KCl, TrisHCl (pH 8,8), MgCl₂, глицерол).

Заключение ОБТК: «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)» серии _____ по своим показателям соответствует требованиям ТУ 9398-002-46395995-2013.

Хранить 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.

Транспортировать крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до 20 °С.

Годен до: _____

Начальник отдела ОБТК



Н.Ю. Минакова

Паспорт № _____
« _____ » _____ 201_ г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

_____ А. Кузубов

«09» ноября 2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации РНК
вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции
в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)»**

2015

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) РНК вирусов денге и желтой лихорадки (ЖЛ) в препаратах НК, выделенных из проб: объектов окружающей среды, насекомых, клинических образцов, вируссодержащей суспензии, биопсийного и аутопсийного материала.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфических патологий (лихорадки денге и желтой лихорадки) 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 лихорадки денге и желтой лихорадки, 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 арбовирусных 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-денге/ЖЛ-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-денге/ЖЛ	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов по 8 микропробирок
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-денге/ЖЛ	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-денге/ЖЛ**, расфасована в микропробирки в стрипах (по 8 штук в каждом) объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимольная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, десять олигонуклеотидных праймеров, шесть 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-денге/ЖЛ**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь синтетических РНК, полученных с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантных плазмид рGem-T с встроенными специфическими фрагментами НК 5' UTR и гена капсида вируса денге и 5' UTR и гена капсида вируса желтой лихорадки.

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 59 °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, включая контрольные образцы.

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.

При амплификации с помощью ОТ-ПЦР-РВ используют четыре олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент генома вируса денге, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент генома вируса желтой лихорадки, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих нуклеиновые кислоты (НК) внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих НК внутреннего

положительного контроля выделения, а также шесть флуоресцентных зондов. Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается 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. Постановка ОТ-ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (BioRad, США), или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Набор реагентов «ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-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** – внутренний положительный контроль выделения РНК; **R6G** – вирус денге; **ROX** – вирус желтой лихорадки; **Cy5** – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК вирусов денге и/или желтой лихорадки. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вирусов денге и/или желтой лихорадки.

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. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

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 И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базах ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Сергиев Посад Московской области) и ЗАО Синтол (г. Москва) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – не более $1,0 \cdot 10^3$ копий РНК в 1 миллилитре пробы (копий·мл⁻¹). Данный показатель достигается при условии объема аликвоты исходного материала (пробы) не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов НК вирусов лихорадки денге и желтой лихорадки (6 заведомо положительных образцов), а также НК вирусов Марбург, Эбола, Ласса, Мачупо, Хунин, ВЭЛ, Западного Нила, лихорадки долины Рифт, клещевого и японского энцефалитов, ККГЛ, ТОРС; бактериях *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetii*, ДНК человека и грызунов, культур клеток Vero, GMK и ВНК, а также РКЭ (24 заведомо отрицательных образца) отсутствовали.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические исследования набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ Вектор (р.п. Кольцово, Новосибирской области). Результаты приведены в приложении к инструкции по применению.

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность МИ «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)» при исследовании 640 положительных проб (320 проб содержащих вирус денге 1-4 с концентрацией 1×10^3 копий/мл и 160 проб содержащих вирус желтой лихорадки с концентрацией 1×10^3 копий/мл, а также 160 мультиплексных проб, содержащих вирусы денге и желтой лихорадки с концентрацией 1×10^3 копий/мл) положительный результат получен в 640 случаях

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 64 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, Западного Нила, лихорадки долины Рифт, венесуэльского энцефаломиеелита лошадей, Ласса, Мачупо, Эбола, Марбург) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^7$ копий/мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 64 случаях.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

Диагностические характеристики применительно к каждому из анализов, а также каждому из типов образцов материала отдельно приведены в Приложении.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусами лихорадки денге и желтой лихорадки проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), 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), МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней»

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.

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

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие 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

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

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

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

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

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

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-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), например, «АНК-32 (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»);

штатив типа «IsoFreeze»;

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 20 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

набор реагентов для выделения ДНК/РНК;

ТЕ-буфер (кат. номер В-014, ЗАО «Синтол»);

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями лихорадки денге и желтой лихорадки, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенных из проб: объектов окружающей среды, насекомых, проб клинических образцов, в вируссодержащей суспензии, биопсийного и аутопсийного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ забор проб крови проводят в ранние сроки болезни (в период вирусемии). Для предотвращения свертывания кровь отбирают с ЭДТА либо цитратом натрия, использовать гепарин запрещается.

Отбор проб насекомых осуществляют в соответствии с МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения НК используют зарегистрированные наборы реагентов сообразно происхождению проб. Для достижения показателей аналитической чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл. Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-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.

Для контроля выделения нуклеиновых кислот используют пробирку с **ВПК-В-РНК** из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-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 **FAM** свидетельствует об успешном выделении РНК.

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 лихорадок денге и желтой лихорадки, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Примечание* Разведенный **ВПК-В-РНК** хранить при температуре не выше минус 20 °С.

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

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления контрольных образцов

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

7.2 Разведение препарата РНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки 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

Анализ проводят в рабочей зоне 3, не подразумевающей контакта с биоматериалом (МУ 1.3.2569-09).

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

- одна микропробирка с **РС-денге/ЖЛ**;
- 15 мкл **РБ**.

На каждый анализ расходуются:

- 20 мкл **ПКО-денге/ЖЛ**;
- 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** и **Cy5**;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50 °C – 900 секунд	1
2	95 °C – 300 секунд	1
3	59 °C – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции	50
4	95 °C – 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-денге/ЖЛ**) в штатив типа «IsoFreeze»** и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки; открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл **РБ**;

**Примечание: До начала работы штатив рекомендуется охладить в бытовом холодильнике до температуры 2-8 °C

- 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 данных микропробирок;

- вносят в микропробирки соответственно маркировке по 20 мкл **ПКО-денге/ЖЛ**, закрывают крышки данных микропробирок;

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

ВНИМАНИЕ! После смешивания РС-денге/ЖЛ, разбавителя и препарата РНК, микропробирки сразу установить в амплификатор и запустить ОТ-ПЦР-РВ.

Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования (таблица 2) и прикатывают крышки микропробирок;

Таблица 2 - Рекомендуемый порядок исследования образцов

<i>№ ячейки</i>	<i>Образец</i>
1	ПКО-денге/ЖЛ
2	ПКО-денге/ЖЛ
3	ОКО
4	ОКО
5	ОКО-В
6	ОКО-В
7	исследуемый образец (проба) 1
8	исследуемый образец (проба) 1
9	исследуемый образец (проба) 2
10	исследуемый образец (проба) 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.

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 **R6G** либо **ROX** относительно отрицательного контроля означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов НК вирусов лихорадки денге или желтой лихорадки в данной микропробирке.

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

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

Учет результатов анализа (толкование характера реакций)

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала **ОКО** по каналам **R6G** или **ROX** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения;

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО-денге/ЖЛ** по каналам **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 **R6G** и **ROX**;

- в случае регистрации роста сигнала по каналу **Cy5******, с любой величиной порогового цикла **Ct**;

- в случае регистрации роста сигнала **ПКО-денге/ЖЛ** по каналам **R6G** и **ROX**, с любой величиной порогового цикла **Ct**.

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

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

В случае добавления **ВПК-В-РНК** на этапе выделения НК:

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

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 3.

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

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

Результат ОТ-ПЦР-РВ по каналу				Образец	Интерпретация
FAM	R6G	ROX	Sy5		
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			
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 денге и ЖЛ
++	—	—	+	ОКО-В	Контаминация отсутствует
—	—	—	+	ОКО	
++	—	—	+	проба	В пробе не обнаружены НК вирусов денге и ЖЛ
любой	+	—	любой		В пробе присутствуют НК вируса денге
	—	+			В пробе присутствуют НК вируса ЖЛ
	+	+			В пробе присутствуют НК вирусов денге и ЖЛ
*Примечание: в случае добавления ВПК-В-РНК на этапе выделения НК					

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например программа АНК_Shell версия 33 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 2.0 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 9398-002-46395995-2013 - 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-денге/ЖЛ-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-002-46395995-2013 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток 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-денге/ЖЛ** и **ВПК-В-РНК** не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использование набора происходит в рабочей зоне 3, не подразумевающей контакта с биоматериалом (МУ 1.3.2569-09). Использованные наборы после анализа препаратов РНК собирают в пластиковые закрывающиеся емкости и выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей утилизации по классу Б (СанПиН 2.1.7.2790-10).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А (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-денге/ЖЛ-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.

Научный директор ЗАО «Синтол»



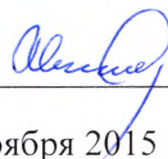
Я.И. Алексеев

«09» ноября 2015 г.

СОГЛАСОВАНО:

И.о. генерального директора
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,
к.м.н., доцент





В.Н. Михеев

«09» ноября 2015 г.

Приложение

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)» на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Всего каждой серией набора реагентов было исследовано 160 проб, содержащих вирус денге (DENV-1-4) и 80 проб, содержащих вирус желтой лихорадки; а также 160 проб, содержащих одновременно вирус денге и вирус желтой лихорадки. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Образец	Положитель- ные образцы*	Подтверждённые положительные образцы	
		серия 020914	серия 150914
Данные по моделированию нагрузки проб вирусом денге			
Клеточные культуры (вируссодержащая жидкость), содержащие вирус денге 1-4	32	32	32
Кровь, содержащая вирус денге 1-4	32	32	32
Мозговая суспензия мышей, содержащая вирус денге 1-4	32	32	32
Пул комаров, содержащих вирус денге 1-4	32	32	32
Пробы окружающей среды, содержащие вирус денге 1-4	32	32	32
Итого проб, содержащих вирус денге 1-4	160	160	160
Данные по моделированию нагрузки проб вирусом желтой лихорадки			
Клеточные культуры (вируссодержащая жидкость), содержащие вирус желтой лихорадки	16	16	16
Кровь, содержащая вирус желтой лихорадки	16	16	16
Мозговая суспензия мышей, содержащая вирус желтой лихорадки	16	16	16
Пул комаров, содержащих вирус желтой лихорадки	16	16	16
Пробы окружающей среды, содержащие вирус желтой лихорадки	16	16	16
Итого проб, содержащих вирус желтой лихорадки	80	80	80

*Согласно интерпретации результатов инструкции по применению

Продолжение таблицы 1

Образец	Положительные образцы*	Подтверждённые положительные образцы	
		серия 020914	серия 150914
Данные по моделированию нагрузки проб одновременно вирусами денге и желтой лихорадки			
Клеточные культуры (вирусодержащая жидкость), содержащие вирус денге 1-4 и желтой лихорадки	32	16 из 16	16 из 16
Кровь, содержащая вирус денге 1-4 и желтой лихорадки	32	16 из 16	16 из 16
Мозговая суспензия мышей, содержащая вирус денге 1-4 и желтой лихорадки	32	16 из 16	16 из 16
Пул комаров, содержащих вирус денге 1-4 и желтой лихорадки	32	16 из 16	16 из 16
Пробы из окружающей среды, содержащие вирус денге 1-4 и вирус желтой лихорадки	32	16 из 16	16 из 16
Итого проб, содержащих вирусы денге 1-4 и желтой лихорадки	160	80 из 80	80 из 80
Итого			
Итого по вирусу денге 1-4 отдельно	160	160	160
Итого по вирусу желтой лихорадки отдельно	80	80	80
Итого по вирусам денге 1-4 и желтой лихорадки одновременно	160	80 из 80	80 из 80
Итого по сериям набора реагентов		320 из 320	320 из 320
Итого		640	

Диагностическая чувствительность МИ «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)» при исследовании наборами двух серий 640 положительных проб (320 проб содержащих вирус денге 1-4 с концентрацией 1×10^3 копий/мл и 160 проб содержащих вирус желтой лихорадки с концентрацией 1×10^3 копий/мл, а также 160 мультиплексных проб, содержащих вирусы денге и желтой лихорадки с концентрацией 1×10^3 копий/мл) положительный результат получен в 640 случаях.

Диагностическая специфичность МИ «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов денге и желтой лихорадки методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-денге/ЖЛ-РВ)» при исследовании 64 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, Западного Нила, лихорадки долины Рифт, венесуэльского энцефаломиелита лошадей, Ласса, Мачупо, Эбола, Марбург) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^7$ копий/мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 64 случаях.

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 22 листов

Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

