

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

А.В. Кузубов

«» 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации НК
вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и возбудителя
лихорадки Ку методом полимеразной цепной реакции в реальном времени
(ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ)»**

2015

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации НК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и возбудителя лихорадки Ку методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ)».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) и ДНК возбудителя лихорадки Ку (бактерия *Coxiella burnetii*) в препаратах НК, выделенных из проб: объектов окружающей среды, воздуха, насекомых, клинических образцов, вируссодержащей суспензии, биопсийного и аутопсийного материала.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфических патологий (Крымской-Конго геморрагической лихорадки и лихорадки Ку) 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 Крымской-Конго геморрагической лихорадки и лихорадки Ку, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, 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-ККГЛ/Ку-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-ККГЛ/Ку	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-ККГЛ/Ку	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-ККГЛ/Ку**, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимольная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, десять олигонуклеотидных праймеров, пять 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-ККГЛ/Ку**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упа-

кованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь синтетической РНК, полученной с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантной плазмиды рGem-T с встроенным специфическим фрагментом НК L-сегмента генома вируса ККГЛ и ДНК рекомбинантной плазмиды рGem-T с встроенным специфическим фрагментом гена супероксиддисмутазы бактерии *C. burnetii*.

Внутренний положительный контроль, **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, включая контрольные образцы.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей опасных 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 нуклеиновых кислот (НК) L-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена супероксиддисмутазы бактерии *C. burnetii*, два олигонуклеотидных праймера,

фланкирующих НК внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих НК внутреннего положительного контроля выделения, а также пять 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-ККГЛ/Ку-РВ» реализует преимущества мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в части одновременного выявления в одной пробе РНК вируса ККГЛ и ДНК бактерии *C. burnetii*, а также двух контролей анализа: ОТ-ПЦР-РВ и выделения РНК, по разным каналам детекции флуоресценции. Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: FAM – внутренний положительный контроль выделения РНК; R6G – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки; ROX – возбудитель лихорадки Ку; Cy5 – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и/или ДНК бактерии *C. burnetii*. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и ДНК бактерии *C. burnetii*.

2.3 Ограничения метода

В инфицированном материале НК микроорганизмов 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 НК 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 РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и ДНК лихорадки Ку (4 заведомо положительных образцов), а также НК вирусов Марбург, Эбола, Ласса, Мачупо, Хунин, ВЭЛ, Западного Нила, денге, желтой лихорадки, 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 (27 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

При проведении исследований наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические исследования набора проведены на базе и ФБУН ГНЦ ВБ Вектор (г.п. Кольцово, Новосибирской области).

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – при исследовании 64 проб клеточных культур (вирусосодержащей жидкости), 64 проб образцов цельной крови, 64 проб образцов мозговой суспензии мышей и 64 проб образцов членистоногих (256 положительных проб), содержащих возбудители Крымской-Конго геморрагической лихорадки и лихорадки Ку с концентрацией 1×10^3 копий/мл, положительный результат получен в 256 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 99 % с достоверной вероятностью 90 %.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 64 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, желтой лихорадки, денге, Западного Нила, лихорадки долины Рифт, венесуэльского энцефаломиелита лошадей) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^7$ копий/мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 64 случаях. Диагностическая специфичность – не менее 96 % с достоверной вероятностью 90 %.

При проведении исследований наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями Крымской-Конго геморрагической лихорадки и лихорадки Ку 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), методических указаний «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки» (МУ 3.1.3.2488-09) и санитарно-эпидемиологических правил "Профилактика коксиеллеза (лихорадка Ку)" (СП 3.1.7.2811-10).

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.

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 Крымской-Конго геморрагической лихорадки и лихорадки Ку, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: объектов окружающей среды, воздуха, насекомых, клинических образцов, 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 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций».

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 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-ККГЛ/Ку-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-ККГЛ/Ку-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.

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

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

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

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

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления контрольных образцов

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

7.2 Разведение препарата ДНК/РНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации РНК вируса ККГЛ и ДНК бактерии *S. burnetii* необходимо внести в реакцию 20 мкл препарата ДНК/РНК. В случае необходимости, раствор препарата НК 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-ККГЛ/Ку;
- 15 мкл РБ.

На каждый анализ расходуются:

- 20 мкл ПКО-ККГЛ/Ку;
- 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	60 °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-ККГЛ/Ку) в штатив для стрипов типа «IsoFreeze»** 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 данных микропробирок;

- вносят в микропробирки соответственно маркировке по 20 мкл ПКО-ККГЛ/Ку, закрывают крышки данных микропробирок;

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

ВНИМАНИЕ! После смешивания РС-ККГЛ/Ку, 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

№ ячейки	Образец
1	ПКО-ККГЛ/Ку
2	ПКО-ККГЛ/Ку
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	

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

***Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях.

- 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.

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 вируса ККГЛ или бактерии *C. burnetii* 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 вируса ККГЛ и бактерии *C. burnetii* 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 вируса ККГЛ и бактерии *C. burnetii* 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-ККГЛ/Ку** 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 C_t ;
- в случае регистрации роста сигнала **ПКО-ККГЛ/Ку** по каналам **R6G** и **ROX**, с любой величиной порогового цикла C_t .

Регистрация роста сигнала по каналу **R6G** в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки. 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 ДНК генома возбудителя лихорадки Ку (*C. burnetii*). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

**** 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**.

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

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

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 3.

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

Результат ПЦР по каналу				Образец	Интерпретация
FAM	R6G	ROX	Cy5		
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 вируса ККГЛ и бактерии <i>Coxiella burnetii</i>
++	—	—	+	ОКО-В	Контаминация отсутствует
—	—	—	+	ОКО	
++	—	—	+	проба	В пробе не обнаружены НК вируса ККГЛ и бактерии <i>Coxiella burnetii</i>
любой	+	—	любой		В пробе присутствует РНК вируса ККГЛ
	—	+			В пробе присутствует ДНК <i>Coxiella burnetii</i>
	+	+			В пробе присутствуют НК вируса ККГЛ и бактерии <i>Coxiella burnetii</i>
*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 9398-008-46395995-2013 - 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-ККГЛ/Ку-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-008-46395995-2013 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-ККГЛ/Ку** и **ВПК-В-РНК** не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям 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).

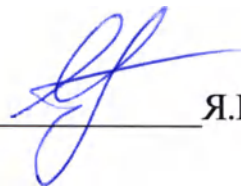
10.5 Гарантийные обязательства производителя

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-ККГЛ/Ку-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 регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

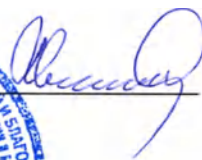
Научный директор ЗАО «Синтол»



Я.И. Алексеев

СОГЛАСОВАНО:

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



В.Н. Михеев



В данном документе
прошнуровано,
пропунктировано и скреплено
печатью 21 листов

Иванов Иван Иванович
прописью
И.И. Иванов
должность, подпись