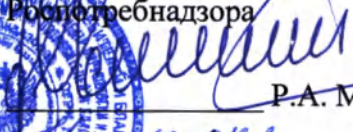


УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФБУИ ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора




Р.А. Максютлов

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для выявления
ДНК вируса оспы обезьян
методом ПЦР
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
(«Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО»)
по ТУ 21.20.23-097-05664012-2022

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» по ТУ 21.20.23-097-05664012-2022.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

«Набор реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» по ТУ 21.20.23-097-05664012-2022 (далее по тексту – набор) предназначен для качественного выявления ДНК вируса оспы обезьян (вид: *Monkeypox*, род: *Orthopoxvirus*, семейство: *Poxviridae*) методом, основанным на амплификации ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме реального времени в образцах нуклеиновых кислот, выделенных из содержимого кожных поражений (в зависимости от стадии болезни – везикул, пустул, корочки, соскоб со дна пузырьков, макул или папул) или из образцов мазков с задней стенки глотки и миндалин или из образцов цельной венозной крови (ЭДТА) или из аутопатов легких, печени и селезенки человека при проведении диагностических исследований и эпидемиологического мониторинга.

Набор применяется с приборами Rotor Gene Q («КИАГЕН ГмбХ», Германия), CFX 96 («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Диагностическая роль набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» заключается в возможности его использования для ранней диагностики вируса оспы обезьян, для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика вируса оспы обезьян, эпидемиологический мониторинг.

Диагностические исследования могут осуществлять лаборатории, имеющие лицензии на проведение экспериментальных и/или диагностических видов работ с возбудителями инфекционных заболеваний I группы патогенности.

1.4 Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Только для профессионального использования.

Показания: в соответствии с назначением набора.

Противопоказаний и побочных эффектов при работе с набором реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» не выявлено.

Набор реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» предназначен только для однократного применения по назначению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 4 реагентов.

№	Состав набора	Описание	Объем (мл)	Кол-во
1.	Реагент-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,75	1 пробирка
2.	Реагент-2	прозрачная бесцветная жидкость	1,25	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец (ПКО)	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка
4.	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	прозрачная бесцветная жидкость	0,20	1 пробирка

В состав набора входит эксплуатационная документация: инструкция по применению

Примечание: Паспорт (аналитический лист) на серию должен входить в комплект сопроводительной документации на продукцию. Число экземпляров (копий) паспорта каждой серии, входящих в комплект сопроводительной документации, должно быть определено в договоре на поставку продукции.

Реагент-1 расфасован по 750 мкл в микропробирку вместимостью от 1,5 до 2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентный зонд.

Реагент-2 расфасован по 1250 мкл в микропробирку вместимостью 1,5 до 2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: HS-Taq ДНК-полимераза в буферном растворе.

Положительный контрольный образец ПКО расфасован по 200 мкл в микропробирку объемом 0,5-2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: раствор рекомбинантной бактериальной плазмиды в ТЕ-буфере, содержащей вставку ДНК, комплементарную участку генома вируса оспы обезьян.

Отрицательный контрольный образец расфасован по 200 мкл в микропробирку объемом 0,5-2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: очищенная вода.

Набор реагентов упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой. Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку. В этом случае пакет и инструкцию по применению вкладывают в коробку.

П р и м е ч а н и е - Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига, составляющая 63 °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 проведение 100 определений, включая контроли.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вируса оспы обезьян основано на использовании метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Метод основан на многократном увеличении числа копий фрагмента вирусной ДНК, что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации.

2.4 Ограничения метода

В инфицированном материале ДНК вирусов может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР и/или недостаточной эффективности выделения нуклеиновых кислот. Для достижения показателя аналитической чувствительности (предел обнаружения (LoD)) 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 ПЦР. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

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

2 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской области) в рамках исследования эффективности набора.

3.1.1 Аналитическая чувствительность (Предел обнаружения (LoD))

Набор реагентов должен выявлять в реакционной смеси 5 копий (1×10^3 копий/мл) СОП ВОО (CDC#v79-I-005), стандартного образца предприятия, содержащего ДНК вируса оспы обезьян, штамм CDC#v79-I-005.

3.1.2 Аналитическая специфичность

Для оценки специфичности набора в рамках клинико-лабораторных испытаний были проведены исследования с биологическим материалом, контаминированным гетерологичными вирусами в концентрации 10^7 копий/мл: вируса простого герпеса 1 типа (штамм H1-03), вируса простого герпеса 2 типа (штамм H2-98), вируса оспы овец (штамм НИСХИ), вируса оспы канареек (штамм Wheatley C-93), вируса кори (штамм Edmonston), вируса краснухи (штамм Краснуха-92), вируса эктромелии (штамм K-1), осповакцины

(штамм Л-ИВП), вируса оспы коров (штамм Кострома 2015). Перекрестно реагирующих вирусов обнаружено не было.

3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость

Повторяемость была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием всех типов анализируемых образцов (положительных) в 5 повторях на наборах реагентов одной серии. Коэффициент вариации повторяемости не превысил 3 %.

Воспроизводимость была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием всех типов анализируемых образцов (положительных) на наборах реагентов двух серий. Коэффициент вариации воспроизводимости не превысил 6 %.

3.2 Диагностические характеристики

Исследования диагностических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области).

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность выявления ДНК вируса оспы обезьян: клинические испытания, проведенные на 100 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97 % -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность выявления ДНК вируса оспы обезьян: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97 % -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Для оценки специфичности были проведены исследования с вирусами: герпеса 1 типа, герпеса 2 типа, оспы овец, оспы канареек, кори, краснухи, экстремелии, осповакцины, оспы коров. Перекрестно реагирующих вирусов обнаружено не было.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Вирус оспы обезьян отнесен к I группе патогенности. Работа с материалом подозрительным на зараженность вирусом оспы обезьян должна проводиться в соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности», МР 3.1.0290-2022 «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян».

Все работы по отбору проб от больных, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводятся в строгом соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные;
- инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности»;
- неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, отходы после амплификации следует удалять в соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике 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 специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп патогенности, не имеющих противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

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 и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности». 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 пробам 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

Аmplификацию проводят на приборах:

- «Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q с принадлежностями», производства "КИАГЕН ГмбХ", Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (далее по тексту - Rotor-Gene Q) или

- «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 исполнения: C1000» производства "Био-Рад Лабораториес, Инк.", США, РУ № ФСЗ 2008/03399 (далее по тексту - 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 и на 20-200 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

- ПЦР-бокс (БАВ-ПЦР «Ламинар-С» («Ламинарные системы», Россия) или аналогичный другого производителя).

- Центрифуга для микропробирок до 12000 об/мин.

- Встряхиватель пробирок «Вортекс».

- Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл.

- Морозильная камера от минус 15 до минус 25°C.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

Наконечники с аэрозольным барьером.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В», (РУ № ФСР 2009/05220) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия.

- 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.

- 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 вирусом оспы обезьян, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» и осуществляется в соответствии СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: содержимого кожных поражений (в зависимости от стадии болезни – везикул, пустул, корочки, соскоб со дна пузырьков, макул или папул), мазков с задней стенки глотки и миндалин, цельной венозной крови (ЭДТА), аутопатов легких, печени и селезенки человека.

6.2 Процедура получения биологического материала

Получение биологического материала для диагностического подтверждения инфекции вирусом оспы обезьян и его транспортирование проводится в соответствии с МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения», СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МР 3.1.0290-2022 «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян».

В качестве проб для диагностического исследования используют:

- Содержимое кожных поражений (в зависимости от стадии болезни – везикул, пустул, корочки, соскоб со дна пузырьков, макул или папул);

- Мазки с задней стенки глотки и миндалин;
- Цельная венозная кровь (ЭДТА);
- В случае смерти - кусочки органов умерших (аутопаты легких, печени и селезенки человека).

Отбор проб, упаковку и транспортирование осуществляют в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Содержимое везикул или пустул отсасывают туберкулиновым шприцем, прокалывая стенку пузырька у его основания: для этой цели может использоваться игла, конец которой помещают над открытой пробиркой и несколько наклоняют его вниз, что облегчает отток жидкости. При недостаточной наполненности пузырьков в периоде подсыхания пустул для получения пробы применяют два способа. После вскрытия пузырька скальпелем или другим острым инструментом сбор остатков жидкости производят небольшими ватными тампонами (на коротком стержне), которые помещают затем в сухую пробирку, отламывая при необходимости стержни. При затруднении в использовании вышеописанного способа скальпелем или маленькими ножницами срезают верхушки пузырьков и помещают их в отдельную пробирку. Корочки отделяют глазным пинцетом. Собранный из 6-10 однородных кожных элементов больного материал помещают в пластиковые пробирки или флаконы с герметически завинчивающимися крышками. Крышки дополнительно фиксируют – например, парафинизированным полиэтиленом (парафильмом), липкой лентой, расплавленным парафином.

При отсутствии у больного кожных поражений, что может иметь место в ранней стадии, болезни берут мазки с задней стенки глотки и миндалин. Процедуру осуществляют с помощью ватных тампонов на стержне, который затем опускают в пластиковую пробирку или флакон, не добавляя жидкости, и герметически ее закрывают. Мазки из зева следует брать и при недостаточном количестве материала из кожных поражений.

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа «Vacuette®» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА). После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

В случае смерти больного с подозрением на оспу обезьян при аутопсии берут фрагменты кожи с поражениями, кусочки внутренних органов (лёгких, печени, почек, селезёнки) (предпочтительнее с макроскопически видимыми поражениями).

Сразу после взятия пробы пробирки маркируют, указывая фамилию и инициалы больного, возраст, день болезни, вид материала (например, кровь, корочки и т.д.) и дату его взятия. Остальные сведения о больном (предполагаемый диагноз, дату поступления, вакцинный статус и пр. указывают в сопроводительной карточке).

После завершения сбора образцов от больного (больных) все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

При сборе клинического материала необходимо учитывать влияние интерферирующих веществ (эндогенных и экзогенных), которые могут встречаться в клинических образцах и ингибировать выделение ДНК (Kovarova M., Draber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Res 2000 Jul 1; 28(13)).

- Эндогенные факторы: гемоглобин (концентрация в крови ~ 160 мг/мл), при проведении ПЦР уменьшает выход при концентрации в реакционной смеси >1 мг/мл, мочевины (в моче ~350 мМ), в среднем, начинает ингибировать при >20 мМ.
- Экзогенные факторы: гепарин (ингибирует ПЦР при концентрации более 0,15 Ед./мл, не устраняется органическими растворителями и переосаждением).

Непригодными для исследования являются:

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

Сведения о других интерферирующих веществах, при условии соблюдения правил взятия исследуемого материала, указанных в инструкции, отсутствуют.

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование отобранного клинического материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 3 суток в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Допускается хранение образцов цельной крови:

- при комнатной температуре – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Образцы отобранного клинического материала хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 суток, при температуре от минус 16 °С 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.

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 вируса оспы обезьян, должны осуществляться в соответствии

с действующими СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Клинический материал, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" (СанПиН 2.1.3684-21) и СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

В соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» для проведения процедуры обеззараживания материал помещают в пробирку объемом 1,5 мл, добавляют 500 мкл лизирующего буфера, на основе 6 М гуанидинизотиоцианата и фенола (1:1) и инкубируют 20 мин при температуре 65 °С.

После проведения процедуры обеззараживания производится выделение ДНК в соответствии с Инструкцией по применению набора реагентов для выделения. В качестве пробы используют 100 мкл материала после проведения процедуры обеззараживания. Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С, и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Внимание! При работе ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

7.1 Процедура приготовления реакционной смеси

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

Приготовление реакционной смеси: в отдельной микропробирке объемом 1,5 мл готовят смесь компонентов следующего состава (из расчета на одну пробу):

Реагент-1	7,5 мкл
Реагент-2	12,5 мкл

Смесь перемешивают пипетированием. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0.5-10, 2-20 и 20-200 мкл.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

Реагент-1	7,5 мкл
Реагент-2	12,5 мкл

На каждый анализ расходуются:

- 5 мкл ПКО;
- 5 мкл ОКО;

8.2 Последовательность проведения этапов анализа

8.2.1 ПЦР-амплификация

Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника, размораживают. Перед использованием встряхивают пробирки с реагентами на микроцентрифуге-вортекс и осаждают капли на дно пробирки кратковременным центрифугированием в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

Для проведения амплификации используют прозрачные тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл в стрипах и планшеты для ПЦР в соответствии с количеством исследуемых образцов.

Помещают микропробирки в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки.

Готовят реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешивают в отдельной пробирке (из расчета на одну пробу):

Реагент-1	7,5 мкл
Реагент-2	12,5 мкл

Открывают крышки микропробирок и вносят в них по 20 мкл реакционной смеси.

Используя наконечники с аэрозольным барьером, в микропробирки последовательно вносят соответственно маркировке образцов 5 мкл ОКО, и затем по 5 мкл образцов выделенных нуклеиновых кислот (см. раздел «7 Подготовка реагентов для анализа» настоящей инструкции по применению), закрывают крышки данных микропробирок. Вносят (в последнюю очередь) 5 мкл ПКО и закрывают крышки данных микропробирок.

Общий (конечный) объем реакционной смеси в каждой пробирке должен составить 25 мкл.

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

Внимание! После смешивания компонентов микропробирки сразу устанавливают в амплификатор и запускают реакцию.

а) При использовании прибора Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) задают следующие параметры в соответствующих диалоговых окнах:

- ротор 36-луночный;
- объем реакционной смеси – 25 мкл;
- оптимизация уровня сигнала для красителя FAM/ Green (Min. Reading/Миним. Сигнал - 5Fl, Max. Reading/Максим. Сигнал - 10Fl)
- температурно-временные режимы:

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Измерение флуоресценции	Количество циклов
95	05:00		1
94	00:15		5
63	01:00		
94	00:15		40
63	01:00	FAM	

После чего запускают программу амплификации и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора.

б) При использовании прибора планшетного типа (например, CFX 96 (BioRad, США) задают следующую программу амплификации:

Внимание! Следует избегать нанесение маркировки на крышки микропробирок, помещенных в амплификатор.

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Измерение флуоресценции	Количество циклов
95	05:00		1
94	00:15		5
63	01:00		
94	00:15		40
63	01:00	FAM	

8.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

ПЦР в режиме реального времени и регистрацию результатов проводят в приборе Rotor Gene Q (Qiagen, Германия), CFX 96 (BioRad, США) по каналу FAM.

а) Для приборов Rotor Gene Q

Анализ результатов амплификации ДНК вируса оспы обезьян проводят по каналу Green, для этого:

- 1) нажать в меню кнопку «Analysis»/ «Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку соответствующего канала;
- 2) отменить автоматический выбор Threshold/Порог;

3) в меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube»/ «Динамич. фон» и «Slope Correct»/«Коррек. Уклона»;

4) в меню основного окна «More setting»/ «Outlier Removal»/ «Устранение выбросов» установит значение NTC threshold/Порог Фона — ПФ (NTC) 15 %;

5) в меню «CT Calculation»/ «Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог=0.02;

6) в таблице результатов (окно «Quant. Results»/ Количественные Результаты) появятся значения Ct.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла "Ct" в соответствующей графе в таблице результатов).

б) Для приборов CFX 96

Анализ результатов амплификации ДНК вируса оспы обезьян проводят по каналу FAM, для этого:

Устанавливают Threshold/Порог на середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла "Ct" в соответствующей графе в таблице результатов).

Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования вирусом оспы обезьян и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

Набор не выявляет наличие вируса оспы обезьян, если концентрация ДНК оспы обезьян ниже аналитической чувствительности (предела обнаружения) теста – 1×10^3 копий/мл образца.

Результат подлежит учету в случае:

а) появления пересечения кривых флуоресценции с пороговой линией на канале FAM в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО);

б) отсутствия положительного сигнала на канале FAM в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО).

Результат считать положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имеет характерную «сигмовидную» форму и пересекает пороговую линию. При этом значение Ct для данного образца должно быть менее 35. Амплитуда сигнала при этом не имеет значения.

Результат считать отрицательным, если значение Ct на канале FAM отсутствует. Если значение Ct больше 35, то ПЦР-РВ необходимо повторить и считать положительным в случае повторения результата или при значении Ct меньше 35.

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения амплификации, гибридизации и учета результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителями приборов. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» хранить в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с ТУ 21.20.23-097-05664012-2022 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Хранение набора реагентов должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с ТУ 21.20.23-097-05664012-2022 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С в термоконтейнере. Допускается транспортирование при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере в течение не более 3 суток. Набор реагентов, транспортируемый с нарушением температурного режима применению не подлежит.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев со дня изготовления 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.

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 с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

Наборы с истекшим сроком годности, вскрытые, но не использованные наборы, а также наборы с поврежденной упаковкой, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.3684-21).

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 «Вектор-ПЦР_{РВ}-ВОО» в течение срока годности направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, Россия, Новосибирская область, рабочий поселок Кольцово, тел. (383) 336-60-10, факс(383) 336-74-09 e-mail: vector@vector.nsc.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 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

11 Анализ научной литературы и (или) неопубликованных данных и сообщений, соотнесенных с предназначенным производителем применением испытуемого медицинского изделия и предлагаемым методом его использования.

Род Orthopoxvirus семейства Poxviridae широко известен двумя представителями – вирусом натуральной оспы, возбудителем одного из наиболее опасных вирусных инфекционных заболеваний человека, и вирусом осповакцины, с помощью которого глобальная кампания по ликвидации натуральной оспы увенчалась успехом. В состав рода также входят такие патогенные для человека зоонозные ортопоксвирусы, как вирусы оспы обезьян и оспы коров, и другие непатогенные для человека вирусы оспы верблюдов (BOVp, CMLV), оспы мышей (вирус экстремелии, ВЭ, ECTV), оспы енотов (RCNV), оспы полевых (VPXV), оспы скунсов (SPXV) и татера поксвирус (TATV) [International Committee on Taxonomy of Viruses – www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp].

В результате отказа от вакцинации против натуральной оспы более 35 лет назад в человеческой популяции с каждым годом становится все меньше людей со специфическим иммунитетом против данного заболевания. Это сделало человечество беззащитным не только перед возможным инфицированием ВНО, но и другими близкородственными ВОО и ВОК, природным резервуаром которых являются мелкие грызуны [Shchelkunov, 2013]. Многочисленные вспышки заболевания оспой обезьян были зарегистрированы в Демократической Республике Конго в 2001-2004 гг. [Learned et al., 2005; Rimoin et al., 2007] и в 2013 г. [Nolen et al., 2015, 2016], в США в 2003 г. [Stephenson, 2003], в Судане в 2005 г. [Damon et al., 2006; Formenty et al., 2010]. Наблюдается обострение эпидемической ситуации в экваториальной Африке с увеличением смертности среди людей в среднем до 9,8 % и возможностью последовательной передачи ВОО среди пациентов (до 6 пассажей) [Learned et al., 2005; Shchelkunov et al., 2005b; McCollum and Damon, 2014].

К традиционным методам детекции ортопоксвирусов относятся электронная микроскопия содержимого кожных поражений и мазков глотки, обнаружение ортопоксвирусных антигенов в клинических образцах с помощью соответствующих тест-систем на основе иммуноферментного анализа (ИФА), методе флуоресцирующих антител (МФА), реакции микропреципитации в агаре (РМПА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА), выявление антител к ортопоксвирусам в сыворотке крови с помощью соответствующих ИФА тест-систем, кроме того проводят выделение возбудителя на куриных эмбрионах или на культуре клеток для подтверждения диагноза и

всесторонней характеристики клинического образца [Мацевич и др., 1996; Shchelkunov et al., 2005b]. С помощью данных методов удастся выявить только родоспецифичные антигены ортопоксвирусов или антитела к ним без возможности видовой дифференциации, а чувствительность данных методов не всегда достаточна для надежного анализа клинического материала. При этом с учетом этапов подготовки и проведения анализа для получения достоверного результата данными методами требуется до 24 ч. Из основных недостатков можно выделить нецелесообразность применения МФА для исследования клинического материала от больного в стадии пустул по причине наличия аутофлуоресценции элементов белой крови, а также зависимость ложноотрицательного результата РМПА и РТГА от качества материала кожных поражений и срока болезни [Мацевич и др., 1996].

Для подтверждения диагноза и дополнительной характеристики изолята проводят последующее выделение возбудителя на куриных эмбрионах или на культуре клеток, требующее от 3 до 6 сут, а предусмотренное при отрицательном результате проведение 2-го пассажа дополнительно удваивает время исследования. При этом определение морфологии оспин на хорионаллантоисной оболочке РКЭ является надежным вирусологическим методом видоспецифичной диагностики ортопоксвирусных инфекций.

Поскольку все традиционные диагностические исследования включают работу с инфекционным материалом, последующее совершенствование средств и методов дифференциальной диагностики ортопоксвирусных инфекций вели в направлении максимального отказа от использования инфекционного материала (только этап выделения вирусной ДНК) и уменьшения сроков исследования для идентификации возбудителя. Наибольшее развитие получили диагностические методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Максютов Р.А., 2017].

Оспа обезьян является редким вирусным зоонозным заболеванием (вызываемым вирусом, передающимся человеку от животных), симптомы которого у человека схожи с симптомами, наблюдавшимися в прошлом у пациентов с натуральной оспой, однако являются менее тяжелыми.

Заражение человека происходит в результате прямого контакта с кровью, биологическими жидкостями, а также пораженной кожей или слизистой инфицированных животных и воздушно-капельным путем при длительном личном контакте.

Одним из возможных факторов риска является употребление в пищу мяса инфицированных животных без надлежащей термической обработки.

Инкубационный период (период времени от инфицирования до появления симптомов) оспы обезьян обычно составляет от 6 до 16 дней, но может колебаться от 5 до 21 дня.

Основные клинические симптомы: сильная головная боль, подъем температуры, боли в мышцах, увеличение лимфатических узлов, кожная сыпь чаще всего появляется на лице, ладонях и ступнях.

Выделяют два периода развития инфекции:

период инвазии (продолжительностью 0-5 дней), для которого характерны лихорадка, сильная головная боль, лимфоденопатия (увеличение лимфатических узлов), боли в спине, миалгия (мышечная боль) и сильная астения (слабость). Лимфоденопатия является патогномоничным симптомом оспы обезьян по сравнению с другими болезнями со схожими первоначальными симптомами (ветряная оспа, корь, натуральная оспа);

период высыпаний на коже, который обычно начинается через один–три дня после повышения температуры. Высыпания чаще концентрируются на лице и конечностях, чем на туловище. В основном они поражают лицо (в 95 процентах случаев), ладони и подошву стоп (в 75 процентах случаев). Кроме того, высыпаниям подвержены слизистые оболочки полости рта (70 процентов), гениталии (30 процентов), конъюнктивы (20 процентов), а также роговица глаз. Высыпания проходят несколько этапов развития: от макулопапул (поражений кожи с плоским основанием) до папул (слегка приподнятых твердых образований), везикул (наполненных прозрачной жидкостью пузырьков) и пустул (наполненных желтоватой жидкостью пузырьков), а затем корочек, которые после высыхают и опадают. Количество кожных поражений на теле человека варьируется от единичных очагов до нескольких тысяч. В тяжелых случаях очаги поражения могут сливаться, что может привести к отслоению больших участков кожи.

Восприимчивостью к вирусу оспы обезьян обладает ряд различных видов животных, среди которых полосатые белки, древесные белки, гамбийские крысы, сони и нечеловекообразные приматы. Естественная история вируса оспы обезьян остается неясной, и для определения точного резервуара вируса и механизма его поддержания в природе необходимы дальнейшие исследования.

Первый случай заражения человека оспой обезьян был зарегистрирован в 1970 г. у девятилетнего мальчика в Демократической Республике Конго, где натуральная оспа была искоренена в 1968 г. С тех пор большинство зарегистрированных случаев заражения людей приходится на страны Центральной и Западной Африки, в основном на сельские поселения близ тропических лесов в долине реки Конго, в частности в Демократической Республике Конго.

За период с 1970 г. случаи заражения человека оспой обезьян были зарегистрированы в 11 африканских странах: Бенине, Камеруне, Центральноафриканской Республике, Демократической Республике Конго, Габоне, Кот-д'Ивуаре, Либерии, Нигерии, Республике Конго, Сьерра-Леоне и Южном Судане. Вирусная нагрузка оспы обезьян доподлинно неизвестна. Так, вспышка оспы обезьян в 1996-1997 гг. в Демократической Республике Конго отличалась более низкой смертностью и более высоким коэффициентом инфицирования по сравнению с обычными показателями. В данном случае истинные или кажущиеся изменения динамики вспышки могли быть вызваны тем, что одновременно со вспышкой оспы обезьян была выявлена вспышка ветряной оспы (возбудитель которой — вирус ветряной оспы — не является ортопоксвирусом). Масштабная вспышка возникла в 2017 г. в Нигерии, где было зарегистрировано более 200 подтвержденных и 500 предполагаемых случаев, а смертность составила около 3 процентов. Сообщения о новых случаях заражения поступают до сих пор.

Оспа обезьян представляет собой заболевание, имеющее значение для общественного здравоохранения на глобальном уровне, поскольку оно затрагивает не только страны Западной и Центральной Африки, но и весь мир. Первая за пределами Африки вспышка оспы обезьян произошла в 2003 г. в Соединенных Штатах Америки, а источником инфицирования стал контакт с зараженными домашними луговыми собачками. Животные содержались вместе с ввезенными из Ганы гамбийскими крысами и сонями. В ходе вспышки в США было зарегистрировано 70 случаев оспы обезьян. Случаи инфицирования оспой обезьян также регистрировались у лиц, прибывших из Нигерии в Израиль (сентябрь 2018 г.), Соединенное Королевство (сентябрь 2018 г., декабрь 2019 г.,

май 2021 г. и май 2022 г.), Сингапур (май 2019 г.) и Соединенные Штаты Америки (июль и ноябрь 2021 г.). В мае 2022 г. из нескольких неэндемичных по вирусу стран поступили сообщения о случаях заболевания оспой обезьян. В настоящее время ведутся исследования эпидемиологии вируса, источников заражения и путей распространения.

Литература:

1. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. // *Вестник Российской Академии Наук.* – 2003. – Т. 73, № 3. – С. 195-204.
2. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. – М.: КМК Scientific Press Ltd., 1998. – 386 с.
3. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы. // *Вопросы вирусологии.* – 2019. – Т. 64, № 5. – С. 206-214.
4. Максютон Р.А. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, 2017 г.
5. Костина Е.В., Гаврилова Е.В., Рябинин В.А., Щелкунов С.Н., Синяков А.Н. Методы ПЦР в реальном времени для идентификации патогенных для человека вирусов натуральной оспы и оспы обезьян // *Вопросы вирусологии.* – 2009. – N 6. – С. 28-33.
6. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox>.

Зав. отделом разработки
и производства средств
диагностики вирусных заболеваний
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

Е.В. Чуб

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

М.П. Богрянцева

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

14 июня 2022 г.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 10 ЛИСТОВ

«14» 06 2024 год

Ген. Директор
ООО «ВЕРИТЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавигус П.К.

