

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

« ____ » _____ 20 ____ г.

№ _____

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



В.Н. Михеев

20 ____ г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора реагентов
для выявления РНК вируса клещевого энцефалита методом ОТ-ПЦР
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ-ВКЭ}»
по ТУ 9398-027-05664012-2014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ОТ	– обратная транскрипция
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РВ	– гибридационно-флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
кДНК	– комплементарная ДНК, получаемая в реакции ОТ на матрице РНК
ПКО	– положительный контрольный образец экстракции РНК и ОТ-ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции РНК и ОТ-ПЦР
ВКО	– внутренний контрольный образец

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» по ТУ 9398-027-05664012-2014.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенной из биологических образцов (плазмы, сыворотки, лейкоцитарной фракции крови, секционного материала и суспензий клещей), методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией фрагмента кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и гибридационно-флуоресцентной детекцией продукта реакции в режиме «реального времени» (РВ).

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика клещевого энцефалита, 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.

Набор реагентов выявляет дальневосточный, европейский и сибирский субтипы вируса клещевого энцефалита.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

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

2.1 Состав набора

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» состоит из 7 реагентов:

№	Реагент	Описание	Объём, мл	Количество
1	HS Taq полимераза, P-1	Опалесцирующая бесцветная жидкость	0,024	1 микропробирка
2	M-MuLV ревертаза, P-2	Опалесцирующая бесцветная жидкость	0,024	1 микропробирка
3	ВКЭ-смесь 1, P-3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 микропробирки
4	ВКЭ-смесь 2, P-4	Прозрачная жидкость розового цвета	0,3	2 микропробирки
5	ВКЭ-положительный контрольный образец (ПКО), P-5	Прозрачная бесцветная жидкость	0,05	4 микропробирки
6	Отрицательный контрольный образец (ОКО), P-6	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	4 микропробирки
7	Внутренний контрольный образец (ВКО), P-7	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 микропробирки

*При хранении раствора ПКО при температуре от минус 16 до минус 20 °С возможно образование растворимого кристаллического осадка.

HS Taq полимераза (P-1) расфасована по 0,024 мл в микропробирку с основанием, вместимостью 0,5 мл, с завинчивающейся крышкой, состав: Hot Start Taq-ДНК-полимераза в буферном растворе.

M-MuLV ревертаза (P-2) расфасована по 0,024 мл в микропробирку с основанием, вместимостью 0,5 мл, с завинчивающейся крышкой, состав: M-MuLV обратная транскриптаза в буферном растворе.

ВКЭ-смесь 1 (P-3) расфасована по 0,6 мл в 2 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, состав: раствор реакционного буфера (10x) для Hot Start Taq-ДНК-полимеразы, хлорид магния, вода очищенная.

ВКЭ-смесь 2 (P-4) расфасована по 0,3 мл в 2 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, состав: раствор 4-х дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов.

Положительный контрольный образец, ПКО (Р-5), расфасован по 0,05 мл в 4 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, состав: инактивированная культуральная жидкость, содержащая вакцинный штамм 205 вируса клещевого энцефалита в лизирующем растворе.

Отрицательный контрольный образец, ОКО (Р-6), расфасован по 1,0 мл в 4 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, состав: раствор ДНК фага.

Внутренний контрольный образец, ВКО (Р-7), расфасован по 0,3 мл в 4 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, состав: неспецифичный к ВКЭ ампликон или рекомбинантная бактериальная плазмида, содержащая неспецифичную к ВКЭ вставку.

Примечание: ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 55 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение анализа 120 проб, включая контрольные образцы, и состоит из комплекта реагентов для ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Реагенты для выделения РНК из биологического материала в состав набора не входят!

Для выделения РНК из биологического материала необходимо дополнительно к набору реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» использовать комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп» производства ООО «НекстБио» (ФСР 2012/1407) или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке.

2.3 Метод исследования

Выявление РНК вируса клещевого энцефалита включает две стадии. На первой стадии после первичной подготовки проб проводят выделение РНК из биологических образцов. Экстракция РНК проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), обеспечивающего контроль процедуры анализа каждой индивидуальной пробы. На второй стадии проводят обратную транскрипцию вирусной РНК с помощью фермента M-MuLV ревертазы и последующую амплификацию фрагмента кДНК в полимеразной цепной реакции при помощи олигонуклеотидных праймеров и фермента HS Taq полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит непосредственно в ходе ПЦР благодаря применению

флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда, гибридизующегося с продуктом реакции (ампликоном) и обеспечивающего дополнительную специфичность метода. Интенсивность флуоресценции возрастает в ходе ПЦР пропорционально накоплению ампликонов, а динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Постановка ОТ-ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, CFX-96 (BioRad, США), «Rotor-Gene 3000/6000» (Corbett Research, Австралия) и «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5 настоящей инструкции), имеющих каналы детекции флуоресценции FAM/Green и HEX/Yellow.

2.4 Ограничения метода

В инфицированном материале РНК вируса клещевого энцефалита может быть не обнаружена по причине ингибирования ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности экстракции РНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность экстракции РНК на уровне не менее 20 %.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе экстракции РНК либо проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательного контрольного образца экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ (ОКО) (пп. 7.2 и 8 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность экстракции РНК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего и положительного контрольных образцов экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ (ВКО и ПКО) (пп. 7.2 и 8 настоящей инструкции).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базах кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России (г. Москва) и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., р.п. Кольцово) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность набора реагентов составляет 1×10^2 копий кДНК вируса клещевого энцефалита в 25 мкл реакционной смеси.

Для достижения показателей чувствительности объем аликвоты исходного материала

(пробы) должен составлять не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов РНК вируса клещевого энцефалита, вирусов Западного Нила и долины Рифт, вируса диареи крупного рогатого скота, вируса полиомиелита, вируса кори, вируса краснухи, вируса инфекционного паротита, вируса бешенства, вирусов гриппа человека и птиц, ДНК вируса ядерного полиэдроза хлопковой совки, ДНК бактериофагов лямбда и Т7, ДНК человека и грызунов отсутствовали.

3.2 Диагностические характеристики

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – при исследовании 141 положительной пробы, содержащей РНК вируса клещевого энцефалита (43 музейных и вакцинных образца ВКЭ, относящиеся к трем основным субтипам вируса: дальневосточному, европейскому и урало-сибирскому, и 98 проб из биологического материала и объектов окружающей среды), при наличии в 25 мкл реакционной смеси 1×10^2 копий кДНК вируса, был получен положительный результат в 141 случае.

Диагностическая чувствительность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 141 отрицательной пробы, не содержащей РНК вируса клещевого энцефалита (23 образца, содержащие РНК гетерологичных вирусов (лихорадки долины Рифт, лихорадки Западного Нила, гриппа человека, гриппа птиц, диареи крупного рогатого скота, уличного бешенства, полиомиелита, кори, краснухи, инфекционного паротита) и 118 проб из биологического материала и объектов окружающей среды), отрицательный ответ в ПЦР получен в 141 случае.

Диагностическая специфичность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусом клещевого энцефалита, проводят с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1318-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», СП 3.1.3.2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита» и

методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций». Утилизация тест-систем с истекшим сроком годности и отработанных препаратов должна соответствовать требованиям СанПиН 2.1.7.2790–10.

Для предотвращения контаминации анализируемых проб при проведении работ с использованием ПЦР пользователям диагностических наборов реагентов необходимо выполнять следующие требования.

1. Разделение лаборатории на зоны (помещения) для каждой из стадий ПЦР-анализа:

ЗОНА 1 для подготовки проб;

ЗОНА 2 для экстракции нуклеиновых кислот;

ЗОНА 3 для приготовления реакционных смесей и постановки ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции.

2. Каждое из помещений лаборатории должно иметь свой набор реагентов, дозаторов, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов, обуви и перчаток, уборочного инвентаря.
 3. Микропробирки и наконечники для дозаторов следует использовать однократно. Необходимо менять наконечники при переходе от одной пробы к другой с целью предотвращения перекрестной контаминации в процессе экстракции нуклеиновых кислот или при внесении реагентов в реакционную смесь.
 4. При постановке анализа следует обязательно применять прилагаемые к набору отрицательный, положительный и внутренний контрольные образцы.
 5. Рабочие зоны (помещения) лаборатории должны подвергаться ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с требованиями руководства Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
 6. Использованные наконечники для дозаторов, микропробирки, другие одноразовые материалы следует подвергать обработке дезинфицирующими средствами, вызывающими деградацию ДНК (например, 0,2 % раствор ДП-2Т) с последующей утилизацией.
- Внимание!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и

реагентов.

Потенциальный риск применения набора – класс 2 б (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

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.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

ЗОНА 1 (подготовки проб):

1. Ламинарный бокс (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип B2).
2. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 16 до минус 20 °С.

3. Набор дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12000 g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
6. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Спирт этиловый, 96 %.
9. Физиологический раствор (0,15 М раствор хлорида натрия).
10. Стерильные фарфоровые чашки и пестики.
11. Одноразовые микропробирки с закручивающейся или плотно закрывающейся крышкой объемом 1,5 мл (например, «Axugen», США).
12. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 200 и до 1000 мкл (например, «Axugen», США).
13. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axugen», США).
14. Отдельный халат, обувь и одноразовые перчатки.
15. Емкость с дезинфицирующим раствором (например, 0,2 % раствор ДП-2Т).

ЗОНА 2 (экстракции нуклеиновых кислот):

1. Ламинарный бокс (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип В2).
2. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 16 до минус 20 °С.
3. Набор дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12000 g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала. Рекомендуется набор «АмплиПрайм РИБО-преп» производства ООО «НекстБио».

9. Одноразовые микропробирки с завинчивающейся или плотно закрывающейся крышечкой объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
10. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 200 и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
12. Отдельный халат, обувь и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором (например, 0,2 % раствор ДП-2Т).

ЗОНА 3 (приготовления реакционных смесей и постановки ОТ-ПЦР):

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: «CFX96» («Bio-Rad», США), «Rotor-Gene 3000/6000» (Corbett Research, Австралия) или «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия). Возможно использование их аналогов, имеющих каналы детекции флуоресценции FAM/Green и HEX/Yellow.
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия) или ламинарный бокс (рекомендуется для снижения риска контаминации и появления ложноположительных результатов).
3. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 16 до минус 20 °С.
4. Набор дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Одноразовые микропробирки, стрипы или планшеты (например, «Axygen», США), рекомендуемые производителем амплификатора.
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 20 и до 200 мкл (например, «Axygen», США).
8. Штативы для микропробирок/стрипов и наконечников (например, «Axygen», США).
9. Отдельный халат, обувь и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором (например, 0,2 % раствор ДП-2Т).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность вирусом клещевого энцефалита, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Исследованию подлежат препараты нуклеиновых кислот, приготовленные (согласно МУ 1.3.2569-09 и МУ 3.1.1027-01) из плазмы, сыворотки, лейкоцитарной фракции крови;

секционного материала и суспензий клещей.

6.2 Процедура получения биологического материала

Порядок работы:

■ Получение плазмы крови

Пробирку с цельной периферической кровью центрифугировать в течение 10 мин при 3000 g. Затем отобрать плазму крови. Для экстракции РНК использовать 100 мкл плазмы.

■ Сыворотка крови не требует предварительной пробоподготовки. Для экстракции РНК использовать 100 мкл сыворотки.

■ Получение лейкоцитарной фракции крови

В пробирку типа «Эппендорф» внести 1,5 мл цельной крови, взятой с ЭДТА, и центрифугировать при 800 g в течение 10 мин, затем верхний слой плазмы (~500 мкл) с лейкоцитами перенести в другую пробирку и центрифугировать в течение 10 мин при 11000 g. Основную часть надосадочной жидкости удалить, а осадок клеток и 100 мкл надосадочной жидкости использовать для экстракции РНК.

■ Приготовление суспензий секционного материала

Образцы секционного материала (тканей мозга) гомогенизировать с использованием стерильных фарфоровых чашек и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем приготовить 10 % суспензии на 0,15 М растворе хлорида натрия. Для экстракции РНК использовать по 100 мкл суспензий.

■ Приготовление суспензий клещей

Отбор проб клещей осуществляют в соответствии с МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций».

При исследовании пулов клещей число голодных особей рода *Ixodes* в одном пуле не должно превышать 10, для напивавшихся клещей – не более 3. Клещей рода *Dermacentor* исследовать индивидуально. Для предварительной промывки поместить клещей в пробирки типа «Эппендорф», добавить по 500 мкл 96 % спирта этилового и встряхнуть на вортексе. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок, после чего жидкость аккуратно удалить с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя. Затем в пробирки с клещами добавить по 500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхнуть на вортексе, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок, после чего жидкость аккуратно удалить с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик или

автоматический гомогенизатор. Клещей растереть/гомогенизировать в 300 мкл (если проба состоит из одного клеща) или в 1 мл (если проба состоит из пула клещей) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая раствор с клещами небольшими объемами, затем полученные суспензии перенести в пробирки типа «Эппендорф», центрифугировать при 10000 об/мин в течение 1 минуты и отобрать по 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

6.3 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Допускается хранение клинического материала до проведения исследования в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С или в течение 1 недели при температуре от минус 16 до минус 20 °С, далее при минус 60 °С и ниже. Клещей предпочтительно хранить живыми во влажной среде (до 1 месяца). В замороженном виде клещей и их суспензии хранить при температуре от минус 16 до минус 20 °С (до 1 недели), далее при минус 60 °С и ниже (до 1 года).

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

6.4 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса клещевого энцефалита, 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 в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Экстракция РНК

Для экстракции РНК вируса клещевого энцефалита из биологического материала рекомендуется использовать комплект реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» производства ООО «НекстБИО», кат. № 104-20 или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке. В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать положительный контрольный образец (ПКО, Р-5) и отрицательный контрольный образец (ОКО, Р-6) из состава набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ», которые обязательно анализируются в ОТ-ПЦР-РВ. Применение ПКО (Р-5) позволяет контролировать

стабильность реагентов, используемых для экстракции нуклеиновых кислот, и компонентов набора, предназначенных для проведения ОТ-ПЦР-РВ. Назначение ОКО (Р-6) – контроль возможной контаминации на этапах экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР-РВ.

Для контроля надлежащего прохождения этапов экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР-РВ в индивидуальных пробах используют внутренний контрольный образец (ВКО, Р-7) из состава набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ».

Порядок работы:

1. Прогреть раствор для лизиса из набора «АмплиПрайм РИБО-преп» в термостате при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов согласно инструкции производителя.
2. Отобрать необходимое количество пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками, включая пробирки для отрицательного (ОКО) и положительного (ПКО) контрольных образцов. Промаркировать пробирки.
3. Внести в каждую пробирку по 10 мкл Р-7.
4. Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса.
5. В пробирки с Р-7 и раствором для лизиса внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером.
6. В пробирку отрицательного контрольного образца внести 100 мкл Р-6.
7. Перемешать раствор Р-5 на вортексе до полного растворения осадка, осадить капли с крышки и стенок пробирки кратковременным центрифугированием и внести в пробирку положительного контрольного образца 10 мкл Р-5 и 90 мкл Р-6.
8. Дальнейшие операции по экстракции РНК проводить согласно инструкции к набору реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп», начиная с п. 4 раздела «Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов»: «Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате».

7.2 Постановка ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

(Общий объем одной реакции – 25 мкл, включая объем РНК-пробы – 10 мкл)

Порядок работы:

1. Приготовить необходимое количество микропробирок/стрипов или планшет (далее «микропробирки») по числу тестируемых проб, включая полученные на стадии экстракции отрицательный и ВКЭ-положительный контрольные образцы (ОКО и ПКО). Для внесения в пробирки реагентов, проб и контрольных образцов используют одноразовые наконечники с

фильтрами. **Внимание!** При использовании амплификатора планшетного типа следует избегать нанесения маркировки на крышки микропробирок.

2. Приготовить реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешать в отдельной пробирке Р-3, Р-4, Р-1 и Р-2 из расчета на **каждую** реакцию:
 - 10 мкл ВКЭ – смеси 1 (Р-3);
 - 5 мкл ВКЭ – смеси 2 (Р-4);
 - 0,2 мкл HS Таq полимеразы (Р-1);
 - 0,2 мкл M-MuLV ревертазы (Р-2);
3. Внести в каждую микропробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.
4. Используя одноразовые наконечники с аэрозольным барьером, внести в микропробирки с реакционной смесью по 10 мкл РНК-проб, включая прошедшие стадию экстракции РНК отрицательный и положительный контрольные образцы (ОКО и ПКО).
5. Поместить микропробирки в амплификатор.
6. Выбрать объем реакционной смеси (25 мкл). Выбрать канал FAM/Green для детекции амплификации кДНК вируса клещевого энцефалита. Выбрать канал HEX/Yellow для детекции амплификации кДНК внутреннего контрольного образца (ВКО).
7. Запрограммировать положение микропробирок с исследуемыми образцами, положительными и отрицательными контролями согласно инструкции к прибору.
8. Провести ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени» согласно следующему протоколу:

Температура, °С	Время	Каналы детекции флуоресценции	Количество циклов
45	30 мин	-	1
94	3 мин	-	1
94	10 с	-	5
55	30 с	-	
72	20 с	-	
94	10 с	-	35
55	30 с	FAM/Green, HEX/Yellow	
72	20 с	-	

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анализа результатов используют программное обеспечение амплификатора. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривых

флуоресценции образцов с пороговыми линиями, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе таблицы результатов программы амплификатора. Пять первых нерегистрируемых циклов амплификации при анализе не учитываются. Для достоверной интерпретации результатов следует учитывать значения «Ct», полученные для положительных, отрицательных и внутреннего контролей:

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		FAM/Green (канал кДНК ВКЭ)	HEX/Yellow (канал ВКО)
ПКО	Экстракция РНК и ОТ-ПЦР	< 25	< 25
ОКО	Экстракция РНК и ОТ-ПЦР	нет или > 32	< 25

Порядок учёта результатов:

- Анализируемый образец считают **отрицательным**, т.е. не содержащим РНК ВКЭ, если значение «Ct» по каналу FAM (канал кДНК ВКЭ) больше **32** или не определяется.

Исключениями являются случаи:

- если для образца, показавшего отрицательный результат, значение «Ct» для внутреннего контрольного образца (ВКО) по каналу HEX превышает **25** или не определяется, то результат анализа считается недостоверным, необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа экстракции;
- если значение «Ct» для положительного контрольного образца (ПКО) по каналу FAM превышает **25** или не определяется, то результаты анализа по всем образцам, показавшим отрицательный результат, считаются недостоверными, необходимо повторить анализ этих образцов, начиная с этапа экстракции.
- Анализируемый образец считают **положительным**, т.е. содержащим РНК ВКЭ, когда кривая накопления флуоресценции имеет характерную экспоненциальную фазу роста и пересекает пороговую линию. При этом значение «Ct» по каналу FAM должно быть не больше **32**. Амплитуда сигнала не имеет значения. Исключением является случай, когда для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналу FAM значение «Ct» меньше или равно **32**. Это свидетельствует о наличии контаминации реагентов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам постановочной серии, для которых был получен положительный результат, считаются недостоверными. Необходимо принять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ этих образцов, начиная

с этапа экстракции.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» хранить в соответствии с ТУ 9398-027-05664012-2014 при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С. Следует избегать длительного размораживания реагентов. Срок годности вскрытых компонентов изделия – в течение срока годности серии набора.

9.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование. Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» транспортировать в соответствии с ТУ 9398-027-05664012-2014 при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере не более трех суток.

9.3 Срок годности набора

Срок годности набора – 12 месяцев со дня изготовления. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9.4 Информация по безопасной утилизации

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).

9.5 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-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВКЭ» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. 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» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую

ООО ЦИРМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В данном деле прошнуровано
пронумеровано и скреплено
печатью 17 1
Секретариат

прописью
И. С. Забелко (с. В. Забелко)
должность, подпись

