

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Синтол»

_____ А. В. Кузубов
«01» _____ 2015г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации
РНК вируса клещевого энцефалита методом полимеразной цепной
реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-КЭ-РВ)
по ТУ 9398-027-46395995-2013»

2015

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вируса клещевого энцефалита методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-КЭ-РВ) по ТУ 9398-027-46395995-2013».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-КЭ-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) РНК вируса клещевого энцефалита (КЭ) в препаратах НК, выделенных из проб: объектов окружающей среды, воздуха, вируссодержащей жидкости, насекомых, крови и спинномозговой жидкости больных, секционного материала.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфической патологии (клещевого энцефалита) 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 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, в эпидемиологических службах для расшифровки вспышек арбовирусных инфекций, а также в стационарных и мобильных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства Обороны.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-КЭ-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-КЭ	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-КЭ	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-КЭ**, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимольная смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, семь олигонуклеотидных праймеров, три флуоресцентных зонда, 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-КЭ** (лиофилизированный), расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с завинчивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: синтетическая РНК, полученная с помощью *in vitro* транскрипции с ре-

комбинантной плазмиды рGem-T с встроенным специфическим фрагментом НК 5'UTR вируса КЭ.

Внутренний положительный контроль выделения, **ВПК-В-РНК** (лиофилизированный), расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с закручивающейся 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 вируса клещевого энцефалита 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 три олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент генома вируса клещевого энцефалита, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих нуклеиновые кислоты (НК) внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих НК внутреннего положительного контроля выделения, а также четыре флуоресцентных зонда. 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-КЭ-РВ» реализует преимущества мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в части одновременного выявления в одной пробе РНК вируса КЭ, а также двух контролей анализа по разным каналам детекции флуоресценции. Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: **FAM** – внутренний положительный контроль выделения РНК; **R6G** – вирус клещевого энцефалита; **Sy5** – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК вируса клещевого энцефалита. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вируса клещевого энцефалита.

2.4 Ограничения метода

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

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

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутренних положительных

контрольных образцов выделения РНК (ВПК-В-РНК) и ОТ-ПЦР-РВ (ВПК) (п. 8.3 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

3.1.1 Чувствительность

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

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов НК вируса клещевого энцефалита (3 заведомо положительных образца), а также НК вирусов Марбург, Эбола, Ласса, Мачупо, Хунин, венесуэльского энцефаломиеелита лошадей, Западного Нила, японского энцефалита, денге, желтой лихорадки, лихорадки долины Рифт, Крымской-Конго геморрагической лихорадки, тяжелого острого респираторного синдрома; бактерий *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetti*, ДНК человека и грызунов, культур клеток Vero, GMK и ВНК, а также РКЭ (28 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

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

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические испытания набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ Вектор (р.п. Кольцово, Новосибирской области).

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – при исследовании 48 проб клеточных культур (вирусодержащей жидкости), 48 пробы образцов сыворотки крови, 48 пробы образцов мозговой суспензии мышей и 48 пробы образцов (192 положительных проб), содержащих вирус клещевого энцефалита с концентрацией 1×10^3 копий/мл, положительный результат получен в 192 случаях. Диагностическая чувствительность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при анализе 208 проб культур клеток, биологического материала и насекомых, не содержащих вирус клещевого энцефалита, а также содержащих гетерологичные микроорганизмы (вирусы японского энцефалита, желтой лихорадки, денге, Западного Нила, долины Рифт, венесуэльского энцефаломиеелита лошадей, бешенства) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^7$ копий/мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 208 случаях. Диагностическая специфичность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90%.

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусом клещевого энцефалита 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), санитарно-эпидемиологических правил «Профилактика клещевого вирусного энцефалита» (СП 3.1.3.2352-08).

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 2б (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 ра-

боты 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;

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

набор реагентов для выделения ДНК/РНК;

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 возбудителем клещевого энцефалита, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-КЭ-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: объектов окружающей среды, воздуха, вирусосодержащей жидкости, насекомых, крови и спинномозговой жидкости больных, секционного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ забор проб крови и спинномозговой жидкости 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

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-КЭ-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-КЭ-РВ». с пробой непосредственно перед внесением сорбента. Регистрация роста сигнала по каналу **FAM** свидетельствует об успешном выделении РНК. Сухое содержимое **ВПК-В-РНК** разводят* 200 мкл элюента из состава наборов реагентов для выделения и 10 мкл полученного раствора добавляют в пробирку.

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Пробы 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 возбудителя клещевого энцефалита, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.1285-03) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал 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-КЭ** добавляют 200 мкл **ОКО** перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Хранение разведенных препаратов **ПКО-КЭ** допускается при температуре не выше минус 20°C не более месяца.

7.2 Разведение препарата РНК (при необходимости)

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

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

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

На каждый анализ расходуются:

- 20 мкл **ПКО-КЭ**;

- 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** и **Cy5**;

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

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

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

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

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

- помещают микропробирки в стрипах (**РС-КЭ**) в штатив типа «IsoFreeze», предварительно охлажденный до температуры от 2 до 8 °С* и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки; открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл **РБ**;

*Примечание: До начала работы штатив охладить в бытовом холодильнике.

- 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-КЭ**, закрывают крышки данных микропробирок;

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

ВНИМАНИЕ! После смешивания **РС-КЭ**, 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 прикрывают крышки микропробирок;

Таблица 2 - Порядок исследования образцов

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

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

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

8.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

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

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

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **R6G** относительно отрицательного контроля означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов НК вируса КЭ в данной микропробирке.

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

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **FAM** в случае отсутствия положительной динамики по каналу **R6G** означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, и дополнительно подтверждает отсутствие специфических фрагментов НК вируса КЭ в данной микропробирке.

Учет результатов анализа (толкование характера реакций)

Результаты анализа не подлежат учету:

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

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО-КЭ** по каналу **R6G** (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 каналу **R6G**;
- в случае регистрации роста сигнала по каналу **Cy5******, с любой величиной порогового цикла **Ct**;

- в случае регистрации роста сигнала **ПКО-КЭ** по каналу **R6G**, с любой величиной порогового цикла **Ct**.

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

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

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

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

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 3.

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

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

Результат ПЦР по каналу			Образец	Интерпретация
FAM	R6G	Cy5		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев				
—	—	—	ПКО	Ложноотрицательный результат , ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
любой	+	любой	ОКО-В	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК
	+		ОКО	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ОТ-ПЦР-РВ
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 КЭ
+	—	+	ОКО-В	Контаминация отсутствует
—	—	+	ОКО	
+	—	+	проба	В пробе не обнаружены НК вируса КЭ
любой	+	любой		В пробе присутствуют НК вируса КЭ
*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 3.3 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 9398-027-46395995-2013 - 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-КЭ-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-027-46395995-2013 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-КЭ** 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-КЭ-РВ» направлять на предприятие-изготовитель ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495) 984-69-93, факс. (499) 977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

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

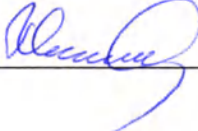
Научный директор ЗАО «Синтол»


_____. Я.И. Алексеев

СОГЛАСОВАНО:

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




_____. В.Н. Михеев

