

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.

«17» апреля 2017



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе и профессиональному образованию
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский Университет)
д.м.н., профессор

Шевченко С.Б.

«17» апреля 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для обнаружения РНК вируса Зика (Zika virus)
методом полимеразной цепной реакции
«ФЛАВИСКРИН-ZIKV»
для диагностики in vitro

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» предназначен для качественного обнаружения РНК вируса Зика в пробах нуклеиновых кислот, выделенных из клинических образцов (сыворотка или плазма крови, моча), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме «реального времени».

Набор предназначен для применения только in vitro.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения Набора реагентов – поддержка клинической лабораторной диагностики специфической патологии - лихорадки Зика, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг.

3. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Набор реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» предназначен для использования специалистами не моложе 18 лет, имеющими соответствующее профильное образование (высшее или среднее медицинское, биологическое или иное образование), получившими дополнительное специальное образование на курсах профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА I-II групп, не имеющие противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты

4. ПРИНЦИП МЕТОДА

Лабораторная диагностика лихорадки Зика основана на анализе сыворотки или плазмы крови на наличие вирусной РНК или специфического иммуноглобулина (Ig) М. При этом серологические тесты обладают низкой специфичностью по отношению к близкородственным флавивирусам (например, вируса желтой лихорадки, вируса Денге и т.д.), специфические антитела обнаруживаются в крови не ранее, чем через 4 суток после проявления симптомов болезни. Во избежание ложноотрицательных результатов в этот период наиболее предпочтительны тесты, основанные на детекции РНК вируса: в течение не более чем 5-7 суток с начала проявления симптомов болезни в сыворотке или плазме крови, и не более чем 20 суток в моче. Тесты, основанные на детекции РНК вируса, отличаются более высокой специфичностью в отношении близкородственных флавивирусов по сравнению с серологическими.

Анализ клинического образца с помощью набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» состоит из двух этапов:

1. Специфической обратимой сорбции РНК в присутствии хаотропных солей (гуанидинтиоцианат) на частицах силики, последующей отмывкой частиц с РНК от белков, солей и других ингибиторов ПЦР с помощью этилового спирта. Очищенный препарат РНК затем подвергается анализу на втором этапе.

2. Выявление специфического фрагмента РНК вируса путем получения ДНК-копии (к-ДНК) с РНК-матрицы с помощью реакции обратной транскрипции и накопления (амплификации) копий данного фрагмента ДНК-мишени с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени». Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозид-трифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок - праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени. В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Сравнение полученных значений Ct с конечными позволяет сделать вывод о наличии РНК вируса Зика и валидности полученных результатов.

Ограничения метода:

1) Для получения сыворотки или плазмы исследуемые образцы крови не должны подвергаться заморозке. Гемолизированная кровь анализу не подлежит.

2) При наличии мутаций в геноме вируса Зика, в частности, на участках гибридизации праймеров или зондов, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

Для получения надежных результатов требуется строгое соблюдение инструкции по применению!

5. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Набор рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

5.1. В состав набора реагентов входят два комплекта, различающиеся условиями хранения:

- Комплект 1 (хранить при температуре плюс 2-8°C);
- Комплект 2 (хранить при температуре минус 18-20°C).

5.2. Состав Комплекта 1 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV».

Таблица 1

Состав	Комплектация
Раствор 1	1 флакон (45 мл)
Раствор 2	1 флакон (40 мл)
Раствор 3	1 флакон (100 мл)
Раствор 4	1 флакон (40 мл)
Сорбент	3 пробирки (по 1 мл)
Раствор для элюции	5 пробирок (по 2 мл)

Все компоненты Комплекта 1 готовы к применению.

5.3. Состав Комплекта 2 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV».

Таблица 2

Компонент	Количество
1. Реакционная смесь*	1 пробирка (1100 мкл)
2. Таq-полимераза (20 ед/мкл).....	1 пробирка (60 мкл)
3. Обратная транскриптаза (100 ед/мкл)....	1 пробирка (12 мкл)
4. Разбавитель.....	2 пробирки (по 2 мл)
5. Дитиотрейтол	1 пробирка (15 мкл)
6. Ингибитор рибонуклеаз (20 ед/мкл).....	1 пробирка (60 мкл)
7. ВКО.....	2 пробирки (по 20 мкл) лиофилизированные
8. Положительный контрольный образец..	2 пробирки (по 20 мкл) лиофилизированные
9. Раствор для восстановления.....	2 пробирки по 2 мл

*В состав Реакционной смеси входят:

раствор дНТФ;

ПЦР-буфер

раствор специфичных праймеров;

флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента вируса Зика содержит флуорофор FAM, зонд для внутреннего контроля (бактериофаг MS2) содержит флуорофор HEX.

праймеры для выявления внутреннего контроля (бактериофаг MS2); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения РНК.

Положительный контрольный образец представляет собой защищенный синтетический рекомбинантный фрагмент РНК вируса Зика.

ВКО представляет собой защищенный синтетический рекомбинантный фрагмент РНК бактериофага MS2.

5.4. Аналитические и диагностические характеристики набора.

Аналитическая чувствительность

С помощью набора «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» можно обнаружить $3 \cdot 10^2$ и более копий/мл РНК вируса Зика в прошедшей обработку (выделение РНК) пробе при объеме пробы не менее 100 мкл. Аналитическая чувствительность проверена на РНК вируса Зика штаммов PaRi-2015 и MR766.

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность анализа определяется используемыми праймерами и флуоресцентными зондами, строго специфичными в отношении фрагмента генома NS2B-NS3 вируса Зика. Набор реагентов выявляет только РНК вируса Зика.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов НК вируса Зика (8 заведомо положительных образца), а также НК вирусов Денге типов 1,2,3,4; Японского энцефалита; лихорадки Западного Нила; Желтой лихорадки; Спундвени (8 заведомо отрицательных образцов), НК человека (7 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

Диагностические характеристики набора реагентов

Для определения диагностической чувствительности и специфичности были приготовлены 100 образцов мочи, 100 образцов сыворотки крови и 100 образцов плазмы крови. В 50 образцов каждого

типа была внесена РНК вируса Зика до конечной концентрации, варьирующей в диапазоне от 10^6 до $3 \cdot 10^2$ копий/мл образца. Наличие или отсутствие аналита в образцах было подтверждено с помощью наборов сравнения QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и «RealStar Zika virus RT-PCR Kit 1.0» (Altona Diagnostics Gmb, Германия). Затем образцы были проанализированы с помощью набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV».

Диагностическая чувствительность определялась как доля, выраженная в %, полученных истинно положительных результатов от суммы полученных истинно положительных и ложно отрицательных, и составила 100%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила 95,5%.

Диагностическая специфичность определялась как доля, выраженная в %, полученных истинно отрицательных результатов от суммы полученных истинно отрицательных и ложно положительных результатов, и составила 100%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила 95,5%.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение РНК из биопробы

- Комплект 1 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV»;
- ламинарный бокс 3-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- аспиратор с колбой-ловушкой для отбора надосадочной жидкости.

2-й этап - проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации и детекций результатов.

- Комплект 2 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV»;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 или 2,0 мл для приготовления амплификационной смеси.
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

7.1. Условия хранения.

Для правильного хранения набор реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» должен быть разукрупнен сразу по завершении транспортировки; хранение компонентов, входящих в набор проводится в разных условиях.

Комплект 1 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» должен храниться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 6 месяцев.

Комплект 2 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 6 месяцев.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности невскрытых

реагентов соответствует заявленному сроку годности набора.

7.2. Транспортирование.

Комплект 1 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» рекомендуется транспортировать при температуре его хранения. Допускается транспортировка набора реагентов в при температуре +18...+25°C в течение 3 суток.

Комплект 2 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» рекомендуется транспортировать при температуре его хранения. Допускается транспортировка набора реагентов в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток, либо при температуре +2...+8°C в течение одних суток.

Изделие транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, по правилам перевозок грузов соответствующих транспортным ведомств.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

8.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 .

8.2. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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».

8.3. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»;

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»;

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами I-II групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- При работе с Раствором 1 и Раствором 2 следует выполнять следующие требования: избегать прямого контакта реагентов с глазами, кожей и одеждой. Реагент может вызывать раздражение глаз, кожи и слизистых оболочек; в случае контакта с реагентом, немедленно промыть кожу большим количеством воды; при контакте реагента с глазами промыть большим количеством воды и немедленно обратиться за медицинской помощью; если реагент случайно проглочен, немедленно вызвать врача!

- При работе с Раствором 3 и Раствором 4 строго соблюдать правила противопожарной безопасности.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Взятие крови на исследование методом ПЦР для обнаружения РНК вируса Зика следует выполнять не позднее, чем через 7 суток после начала болезни. Для проведения исследований берется венозная кровь в объеме 3-5 мл в вакуумные пробирки (вакутейнеры). При этом необходимый в каждом случае объем крови указан на этикетке пробирки. Пробирки с кровью транспортируют в термоконтейнерах с надписью «Пробы крови для лабораторных исследований» в течение суток. В термоконтейнере должна поддерживаться температура от +2° до +8°С.

При использовании вакутейнера с ЭДТА для получения плазмы пробирку с кровью отстаивают не менее 1 часа при температуре +2° до +8°С. После этого кровь должна расслоиться на плазму и форменные элементы. Если кровь не расслоилась, перемешать кровь переворачиванием и отобрать 1,5 мл крови в стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Центрифугировать пробирку 5 мин при 5000 об/мин. Не задевая интерфазу отдельными наконечниками с фильтром перенести плазму в чистую полипропиленовую пробирку. Полученную плазму использовать для выделения РНК. Плазму крови можно хранить при температуре не выше минус 18°С не более 1 месяца.

При использовании вакутейнера без антикоагулянта для получения сыворотки пробирку с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термокювету при 37°С на 15 мин. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной. Полученную сыворотку использовать для выделения РНК. Сыворотку крови можно хранить при температуре не выше минус 18°С не более 1 месяца.

Забор мочи на исследование методом ПЦР для обнаружения РНК вируса Зика следует выполнять не позднее, чем через 20 суток после начала болезни.

Собрать мочу в количестве 20-30 мл в сухой стерильный флакон с плотно закручивающейся крышкой объемом 50 мл. Мочу транспортировать при +2...+8 °С не более 1 суток.

9.2. Выделение РНК.

9.2.1. Подготовка ВКО.

9.2.1.1. В пробирку с лиофилизированным ВКО добавить 650 мкл Раствора для восстановления из Комплект 1 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV». Инкубировать при комнатной температуре 10 минут.

9.2.1.2. Перемешать содержимое вортиксованием в течение 10 секунд и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель.

После восстановления ВКО следует хранить при +2...8°С в течение 3 месяцев.

9.2.2. Выделение РНК.

За 15-20 минут до начала работы раствор 1 перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. После растворения кристаллов раствор перемешать переворачиванием. Допустимо прогревание раствора в течение 10 минут при 60 градусах.

9.2.2.1. В промаркированные пробирки на 1,5 мл внести по 450 мкл **1-ого раствора**.

9.2.2.2. В каждую пробирку с раствором 1 внести по 100 мкл исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови или мочи и 5 мкл ВКО. В пробирку отрицательного контроля внести 100 мкл раствора для восстановления и 5 мкл ВКО.

9.2.2.3. Пробирки закрыть и тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 10 секунд.

9.2.2.4. Осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

9.2.2.5. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного **сорбента**.

9.2.2.6. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 1-2 мин, еще раз перемешать и оставить на 10 мин.

9.2.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя аспиратор с колбой-ловушкой.

9.2.2.8. Добавить в пробирки по 400 мкл **2-ого раствора** для выделения РНК. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя аспиратор с колбой-ловушкой.

9.2.2.9. Добавить в пробирки по 500 мкл **3-его раствора** для выделения РНК. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки на

микроцентрифуге при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя аспиратор с колбой-ловушкой.

Повторить пункт 9.2.2.9.

9.2.2.10. Добавить в пробирки по 400 мкл **4-ого раствора** для выделения РНК. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя аспиратор с колбой-ловушкой.

9.2.2.11. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 60°C на 10-15 мин.

9.2.2.12. Ресуспендировать сорбент в **100 мкл Раствора для элюции** с помощью вортекса. Прогреть в термостате при температуре 60°C 2-3 мин, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при максимальных оборотах микроцентрифуги (12-14,5 тыс. об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

Реакцию амплификации рекомендуется проводить сразу после выделения РНК! Отбирать раствор следует осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутится, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная РНК может храниться до 4 часов при +2-8°C либо в течение 2 месяцев при температуре -20°C.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Добавить в пробирку положительного контрольного образца 800 мкл Раствора для восстановления. Инкубировать при комнатной температуре 10 минут, затем перемешать содержимое вортексированием в течение 10 секунд и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. После восстановления Положительный контрольный образец следует хранить при -18...20°C в течение 3 месяцев. Второй комплект использовать по мере необходимости.

10.2. Приготовить и, по возможности, пронумеровать **бесцветные** пробирки емкостью 0,2 мл.

10.3. За 20 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь Комплект 2 набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Таq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

10.4. Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для обратной транскрипции с ПЦР-амплификацией из расчета на 1 пробу (табл. 3).

Таблица 3

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	20
Реакционная смесь	10
Дитиотрейтол (DTT)	0,1
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,1
Таq-полимераза	0,5

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

10.5. После добавления ферментов, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь вортексированием в течение 10 секунд и осадить капли с крышки пробирки.

10.6. Внести в микропробирки по **30 мкл готовой амплификационной смеси**. Неиспользованные остатки амплификационной смеси выбросить.

10.7. Добавить в пробирки с амплификационной смесью по **20 мкл:**

- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы;

- в пробирки положительного контрольного образца - положительный контрольный образец из комплекта набора;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

10.8. Пробирки центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе для осаждения капель со стенок пробирок.

10.9. Поместить пробирки в амплификатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени» и провести ОТ-ПЦР-амплификацию по следующей программе:

Rotor Gene Q		
+37°C	40 мин	
+95°C	5 мин	
+95°C	15 сек	45 циклов
+55°C	45 сек*	
+72°C	10 сек	

* измерение флуоресценции по каналам FAM (Green) и HEX (Yellow).

Примечание. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора. (www.lytech.ru)

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

12. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации.

12.2. Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV», представлены в таблице 4 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Таблица 4

Флуорофор	Возбудитель	Dynamic Tube	Slope correct	Baseline threshold	Outer removal	Конечный цикл (КЦ)
HEX (Yellow)	ВКО	on	on	0,03	10%	35
FAM (Green)	РНК вируса Зика	on	on	0,03	10%	45

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

	Ct FAM (Green)	Ct HEX (Yellow)	Интерпретация
Положительный контрольный образец	от 24 до 28	>35	Специфическая реакция прошла.
Отрицательный контрольный образец (ВКО)	НЗ	<35	Специфическая контаминация отсутствует.
	<45	любой	Контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.
Анализируемый образец	<45	любой	ПРИСУТСТВИЕ РНК вируса Зика
	НЗ	<35	ОТСУТСТВИЕ РНК вируса Зика
	любой	НЗ или >35	Ингибирование или недостаточное выделение РНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

НЗ – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА.

Перед проведением анализов от пациентов при использовании новой серии набора реагентов «ФЛАВИСКРИН-ZIKV» необходимо провести контроль качества работы набора.

13.1. Контроль внешнего вида компонентов.

Внешний вид компонентов набора должен соответствовать характеристикам, представленным в таблице 6.

Таблица 6.

Компонент	Внешний вид
Комплект 1	
Раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор 3	Прозрачная бесцветная жидкость
Раствор 4	Прозрачная бесцветная жидкость
Сорбент	Суспензия белого цвета
Раствор для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость
Комплект 2	
Реакционная смесь	Прозрачная жидкость розового цвета
Тақ-полимераза (20 ед/мкл)	Бесцветная прозрачная вязкая жидкость
Обратная транскриптаза (100 ед/мкл)	Бесцветная прозрачная вязкая жидкость
Разбавитель	Бесцветная прозрачная жидкость
Дитиотрейтол	Бесцветная прозрачная жидкость
Ингибитор рибонуклеаз (20 ед/мкл)	Бесцветная прозрачная вязкая жидкость
ВКО	Сухой порошок белого цвета
Положительный контрольный образец	Сухой порошок белого цвета
Раствор для восстановления	Бесцветная прозрачная жидкость

13.2. Контроль технических характеристик набора.

13.2.1. Подготовить Отрицательный контрольный образец, содержащий ВКО, в соответствии с протоколом, представленном в разделе 9.2.2. настоящей инструкции.

13.2.2. Проведение анализа.

Провести выделение РНК из Отрицательного контрольного образца, содержащего ВКО согласно разделу 9.2.2. настоящей инструкции.

Провести ОТ-ПЦР-амплификацию положительного и отрицательного контрольного образца, содержащего ВКО, в соответствии с протоколом, описанным в разделе 10 данной инструкции.

13.2.3. Учет и анализ результатов провести в соответствии протоколом, представленным в разделе 12 настоящей инструкции.

Таблица 7.

	Ct FAM	Ct HEX
Положительный контрольный образец	от 24 до 28	НД
Отрицательный контрольный образец (ВКО)	НД	< 35

Результат контроля. Во всех случаях несоответствия получаемых результатов данным Таблицы 7 реагенты признаются непригодными к использованию. При этом осуществляется их полная замена и повторное исследование контрольных образцов до получения положительного результата контрольных испытаний.

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают раздавливанием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор. Твердые компоненты подлежат дроблению, последующему разведению водой в соотношении 1:100, сливом раствора в промышленную канализацию и вывозом остатков упаковок как производственного или бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожают путем сжигания.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора «ФЛАВИСКРИН-ZIKV», следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственного отдела
ООО НПФ «Литех»



С.Г.Байцур

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России



А.В. Васин

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
листа 10 (ов)

Директор ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России



Прошито, проверено,
скреплено печатью.
Количество листов

10 шт.
Директор _____
Наумов А.Ю.

