

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И.Покровский

«*21 Октября*» 2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения РНК вируса
лихорадки Эбола, вариант Заир (*EBOV Zaire*), в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

для диагностики *in vitro*

«АмплиСенс® *EBOV Zaire-FL*»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	13
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	15
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	17
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F).....	19
СОСТАВ	19
РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	19
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР.....	20
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	21
В. Анализ и интерпретация результатов	22
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L).....	25
СОСТАВ	25
РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	25
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР.....	25
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	26
В. Анализ и интерпретация результатов	27
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	30
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	31
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87-rec	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К+	- положительный контроль ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>EBOV</i>	- вирус лихорадки Эбола
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *EBOV* Zaire-FL» предназначен для качественного определения РНК вируса лихорадки Эбола, вариант Заир (*EBOV* Zaire), в биологическом материале, полученном от человека (цельная кровь, слюна, моча, тканевой биопсийный материал), методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на лихорадку Эбола вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании

которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала с внутренним контрольным образцом (ВКО STI-87-rec) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО STI-87-rec с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО STI-87-rec позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-Реввертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация кДНК *EBOV Zaire* и амплификация последовательности кДНК ВКО STI-87-rec. Результаты амплификации кДНК *EBOV Zaire* и кДНК ВКО ВКО STI-87-rec регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК <i>EBOV Zaire</i>
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	L-gene

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 и 2 предназначены для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять РНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для обратной транскрипции, амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ¹
Цельная кровь, слюна, моча, тканевой биопсийный материал	«РИБО-золь-А»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	10 ⁴
	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	2x10 ³
	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	2x10 ³
	QIAGEN QIAamp MinElute Virus	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-L	2x10 ³

¹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

Данная чувствительность достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих вирусов и штаммов микроорганизмов: *Tahyna virus*, *Batai virus*, *Inkoo virus*, *CCHFV*, *Dhori virus*, *Yellow fever virus*, *WNV*, *Sindbis virus*, *Chikungunya virus*, *Rubella virus*, *Kemerovo virus*, *Rotavirus*, *Enteric Cytopathic Human Orphan virus*, *HIV*, *Rabies virus*, *CMV*, *Human parvovirus B19*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов РНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Воспроизводимость и повторяемость

В качестве положительных образцов использовали биологический материал с добавлением стандарта вируса лихорадки Эбола, производства Института Коха (Берлин, Германия) в концентрации 10^5 ГЭ/мл.

Таблица 3

Вид исследуемого материала	Количество повторов	Коэффициент вариации CV, %
Разброс значений внутри одного теста		
Цельная кровь	6	1,68
Слюна	6	0,64
Моча	6	1,11
Тканевой биопсийный материал	6	0,74
Разброс значений между тестами, проведенными в разные дни		
Цельная кровь	12	3,57
Слюна	12	1,13
Моча	12	1,09
Тканевой биопсийный материал	12	0,89

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® EBOV Zaire-FL» в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® EBOV Zaire-FL»		Результаты применения референтного метода ²	
			положительных	отрицательных
Цельная кровь	Всего исследовано 100 образцов	положительных	48	0
		отрицательных	0	52
Слюна	Всего исследовано 100 образцов	положительных	29	0
		отрицательных	0	71
Тканевой биопсийный материал	Всего исследовано 100 образцов	положительных	34	0
		отрицательных	0	66
Моча	Всего исследовано 100 образцов	положительных	43	0
		отрицательных	0	57

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® EBOV Zaire-FL»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %	Диагностическая специфичность ⁴ , (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %
Цельная кровь	95	95
Слюна	93	97
Тканевой биопсийный материал	93	96
Моча	94	95

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1285-03 «Безопасность

² В качестве метода сравнения использовалась диагностическая система RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 для выявления методом ПЦР в реальном времени РНК вирусов Эбола и Марбург (Altona Diagnostics GmbH, Германия).

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу с ними в биологическом кабинете в соответствии СП 1.3.1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты следует удалять в соответствии с требованием СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»

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.

- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые

наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁵. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с патогеном.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

⁵ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
3. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

4. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ПУ № ФСР 2009/05514) или «Транспортная среда для мазков» (ПУ № ФСР 2009/05515) или другие рекомендованные Производителем.
5. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen,

- Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 9. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 10. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
 11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
 12. Автоматические дозаторы переменного объема (например, «Biohit» («Биохит»), Финляндия, «Ленпипет», Россия).
 13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

16. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-золь-А» (РУ ФСР 2008/03152), «РИБО-преп» (РУ ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ ФСР 2010/07265), QIAGEN QIAamp MinElute Virus (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.
18. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США или аналогичные).
19. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen,

- Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
20. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 21. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 22. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 23. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 24. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
 25. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 26. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 27. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
 28. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 29. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 30. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 31. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

32. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен,

- Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные).
33. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
34. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
35. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
36. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
37. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
38. Программируемый амплификатор роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) и другие рекомендованные Производителем).
39. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
40. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
41. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь,
- слюна,
- моча,

- тканевой биопсийный материал.

Цельная кровь

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 % EDTA). После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов цельной крови:

- при комнатной температуре – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 часов.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Слюна

Перед получением слюны следует провести трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирать в одноразовые сухие стерильные пробирки на 2 мл в количестве не менее 1 мл.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Допускается хранение образцов слюны:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительное хранение.

Моча

Для анализа отбирают мочу в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на 50-60 мл.

Допускается хранение образцов мочи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание

материала.

Тканевой биопсийный материал

Биоптат отбирают чистым стерильным инструментом в стерильные пластиковые контейнеры с плотно закрывающимися крышками или пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают.

Допускается хранение образцов биопсийного материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительно.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы крови, слюны не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки. Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 минут при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» или «Транспортную среду для мазков» до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Допускается хранение предобработанных образцов мочи до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы биопсийного материала требуют предварительной подготовки. Для экстракции РНК берут 30-50 мг материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани готовят суспензию на охлаждённом стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для этого на 1 объём растёртой ткани добавляют 5 объёмов физиологического раствора или фосфатного буфера. 100 мкл полученной суспензии используют для экстракции РНК.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов биопсийного материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительно.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации. Для контроля эффективности экстракции РНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов κДНК ВКО STI-87-гес, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются:

- образцы мочи, собранные ранее 24 часов от момента доставки в лабораторию;
- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для экстракции РНК используются комплекты реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-А», «МАГНО-сорб», QIAGEN QIAamp MinElute Virus и другие рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-А», «МАГНО-сорб», QIAGEN QIAamp MinElute Virus смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-А» и МАГНО-сорб»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87-rec**.

Объем **ВКО STI-87-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО EBOV Zaire**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов QIAGEN QIAamp MinElute Virus:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87-rec**.

Объем **ВКО STI-87-rec** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **200 мкл.**

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **190 мкл ОКО.**

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **190 мкл ОКО и 10 мкл ПКО *EBOV Zaire.***

Объем элюции – **50 мкл.**

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента гДНК вируса лихорадки Эбола, вариант Заир (*EBOV Zaire*), с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>EBOV Zaire</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Реввертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ <i>EBOV Zaire</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО <i>EBOV Zaire</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ гДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Необходимо использовать тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для

ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт с крышками.

Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК– 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *EBOV Zaire*, 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,5 мкл полимеразы (TaqF), 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMiv), 0,25 мкл RT-G-mix-2.** Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *EBOV Zaire*.** Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL *EBOV Zaire*, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMiv), RT-G-mix-2** в количестве согласно расчетной таблице, приведенной **приложении 1**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать

попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

7. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ EBOV Zaire / STI**.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР** – внести в пробирку **10 мкл К–**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО EBOV Zaire**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 6)
2. Запустить выполнение программы амплификации.

Примечание. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 6

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	55	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	10 с	–	40
	55	20 с	FAM, JOE	
	72	15 с	–	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE**.

3. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
4. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам (табл.7):

Таблица 7

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК <i>EBOV</i> Zaire

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла

C_t в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 8

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	РНК <i>EBOV</i> Zaire НЕ обнаружена
<u>определено</u> или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>EBOV</i> Zaire обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К-	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE

- отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
 3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
 4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
 5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента гДНК вируса лихорадки Эбола, вариант Заир (*EBOV Zaire*), с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>EBOV Zaire-Lyo</i>	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
К+ <i>EBOV Zaire / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО <i>EBOV Zaire</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ гДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК– 25 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок для

амплификации с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью EBOV Zaire-Lyo** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).

2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ EBOV Zaire / STI**
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР** – внести в пробирку **25 мкл К–**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО EBOV Zaire**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 10).

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	55	20 с	–	
	72	15 с	–	
4	95	10 с	–	40
	55	20 с	FAM, JOE	
	72	15 с	–	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам (табл.11):

Таблица 11

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК EBOV Zaire

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла

Ct в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	РНК <i>EBOV</i> Zaire НЕ обнаружена
<u>определено</u> или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	РНК <i>EBOV</i> Zaire обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 13 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 13

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
К-	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *EBOV Zaire*, ПЦР-буфер-С, RT-G-mix-2, полимеразу (TaqF), ТМ-ревертазу (MMIv) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *EBOV Zaire* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *EBOV Zaire-Lyo* хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® EBOV Zaire-FL» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2 (тел. (495) 664-28-84, факс (495) 664-28-89, e-mail: cs@ilslab.ru)⁶.

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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

И.о. генерального директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»



В.Н. Михеев

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		Беречь от влаги

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Схема приготовления реакционных смесей для ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

		Объем реагентов на указанное количество реакций				
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Количество исследуемых образцов	Количество во реакций ⁷	ПЦР-смесь-FL EBOV Zaire	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
1	6	60	30	1,5	3,0	1,5
3	8	80	40	2,0	4,0	2,0
5	10	100	50	2,5	5,0	2,5
7	12	120	60	3,0	6,0	3,0
9	14	140	70	3,5	7,0	3,5
11	16	160	80	4,0	8,0	4,0
13	18	180	90	4,5	9,0	4,5
15	20	200	100	5,0	10,0	5,0
17	22	220	110	5,5	11,0	5,5
19	24	240	120	6,0	12,0	6,0
21	26	260	130	6,5	13,0	6,5
23	28	280	140	7,0	14,0	7,0
25	30	300	150	7,5	15,0	7,5
27	32	320	160	8,0	16,0	8,0

⁷ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции и ОТ-ПЦР (ОК, ПК, К+, К-) + запас на один образец. (N+4+1, где N-количество исследуемых образцов).