

УТВЕРЖДАЮ

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

В.В.Малеев

«28» марта 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для качественного
определения РНК вируса Зика (*Zika virus, ZIKV*) в
биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) для диагностики *in vitro*

«АмплиСенс® *Zika virus-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
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	21
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F).....	23
СОСТАВ	23
РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	23
А. Подготовка пробирок для ОТ-ПЦР.....	24
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО ICZ-rec	- экзогенный внутренний контрольный образец
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
ZIKV	- <i>Zika virus</i> , вирус Зика
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс[®] *Zika virus*-FL» предназначен для качественного определения РНК вируса Зика в биологическом материале (плазма крови, слюна, моча, сперма, тканевой (аутопсийный/биопсийный, плацента) материал, амниотическая жидкость, комары, мазки из ротоглотки) 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 Зика вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированной 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 совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО *ICZ-rec*) и одновременном проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО *ICZ-rec* с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО *ICZ-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 *Zika virus*, а также амплификация последовательности кДНК ВКО *ICZ-rec*. Результаты амплификации кДНК *Zika virus* и кДНК ВКО *ICZ-rec* регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО <i>ICZ-rec</i>	кДНК <i>Zika virus</i>
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	NS3

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-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.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность, копий /мл
Плазма крови	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	2000
Комары (гомогенат)	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	2000
Моча	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	2000
Слюна	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	2000
Мазки из ротоглотки	100		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	2000
Тканевой (аутопсийный / биопсийный) материал, плацента	50		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10000
Сперма	50		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10000
Амниотическая жидкость	50		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	10000
Плазма крови	200	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1000
	1000		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	100
Моча	1000		«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	500

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: флавивирусов: *DV* (вирус Денге), *WNV* (вирус Западного Нила), *JEV* (вирус японского энцефалита), *OHFV* (вирус омской геморрагической лихорадки), *TBEV* (вирус клещевого энцефалита), *LGT* (вирус Лангат), *POWV* (вирус Повассан), *YFV* (вируса желтой лихорадки), *SPOV* (вируса Спандвени), а также *СCHFV* (вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки), *CHV* (вирус чикунгуни), риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок (*R.sibirica*, *R.conorii*, *R.raoultii*, *R.heilonjiangensis*, *R.slovaca*), а также геномной ДНК человека.

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® Zika virus-FL»

в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® Zika virus-FL»		Результаты применения референтного метода ¹	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего исследовано 56 образца	положительных	1	0
		отрицательных	0	55
Моча	Всего исследовано 27 образцов	положительных	9	0
		отрицательных	0	18
Слюна	Всего исследовано 26 образцов	положительных	3	0
		отрицательных	0	23

Были использованы 109 клинических образцов, полученных от пациентов, обратившихся к врачу с симптомами заболевания, не исключаящего лихорадку Зика.

¹ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0» (Altona Diagnostics GmbH).

**Результаты тестирования набора реагентов
«АмплиСенс® *Zika virus*-FL» с использованием материала
от здоровых людей и пациентов с иной этиологией
заболевания и образцов, контаминированных
инактивированным штаммом вируса Зика или СОП № 198
ПКО *ZIKV*-rec**

Тип образцов	Характеристика образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Zika virus</i> -FL»		
		положительных	отрицательных	
Плазма крови	Всего исследовано 76 образцов	положительных	76	0
		отрицательных	0	0
Моча	Всего исследовано 54 образца	положительных	54	0
		отрицательных	0	0
Слюна	Всего исследовано 22 образца	положительных	22	0
		отрицательных	0	0
Мазки из ротоглотки	Всего исследовано 47 образцов	положительных	22	0
		отрицательных	0	25
Комары	Всего исследовано 57 образцов	положительных	32	0
		отрицательных	0	25
Тканевой (биопсийный / аутопсийный) материал	Всего исследовано 47 образца	положительных	22	0
		отрицательных	0	25
Сперма	Всего исследовано 47 образца	положительных	22	0
		отрицательных	0	25
Амниотическая жидкость	Всего исследовано 45 образца	положительных	20	0
		отрицательных	0	25

Были использованы:

- 270 модельных образцов биологического материала, контаминированного инактивированным штаммом вируса Зика или СОП № 198 ПКО *ZIKV*-rec, в диапазоне концентраций от соответствующих аналитической чувствительности набора до превышающих ее в 2,5-5 раз.
- 125 проб биологического материала от здоровых людей или пациентов с иной патологией заболевания, не посещавших в течение года страны, эндемичные по лихорадке Зика; комаров не содержащих вирус Зика.

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® Zika virus-FL»**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность ³ , (с доверительной вероятностью 90 %), в интервале (%)
Плазма крови	95-100	95-100
Моча	95-100	86-100
Слюна	90-100	86-100
Комары	92-100	90-100
Мазки из ротоглотки	89-100	90-100
Сперма	89-100	90-100
Тканевой (аутопсийный/биопсийный) материал	89-100	90-100
Амниотическая жидкость	89-100	90-100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Вирус Зика относится ко II группе патогенности (СП 1.3.3118-13).

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

В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»:

- диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

"Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197);

- исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные.
- Инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
- 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, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. 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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- 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 организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и

слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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. «Транспортная среда для мазков» (РУ № ФСР 2009/05515).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
3. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

7. Реагент «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки слюны, спермы и амниотической жидкости.

8. 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).
9. Глицерин для проведения пробоподготовки мочи.
10. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и комаров (например, TissueLyser LT (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), или аналогичный).
15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
16. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

21. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп» (РУ

№ ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265) или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

23. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и другие рекомендованные Производителем).

24. Набор реагентов и расходных материалов к автоматической станции. (Например, МАГНО-сорб (РУ № ФСР 2010/07265))

25. Набор расходных материалов к автоматической станции, например:

- Набор из 10 ванночек для реагентов (например, Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария, или аналогичный);
- Наконечники на 1000 мкл в штативе (не более 30 штативов по 96 шт.) (например, Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария, или аналогичные);
- Плашки для ПЦР на 48 лунок – с квадратными лунками объемом 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

26. 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 выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) 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) – при использовании прибора роторного типа.
27. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 28. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 29. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 30. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 31. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 32. Программируемый амплификатор 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), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Производителем).
 33. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 34. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 35. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма крови,
- тканевой (биопсийный/аутопсийный, плацента) материал,
- слюна,
- моча,

- сперма,
- амниотическая жидкость,
- комары,
- мазки из ротоглотки.

Исследуемый материал отбирается персоналом медицинского учреждения.

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса Зика, должны осуществляться в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Плазма крови

Для получения образцов плазмы крови забор крови проводят утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА (специальную вакуумную систему) в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого центрифугируют пробирки с цельной кровью при 800-1600 г (например, 3500-5000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 20 минут при комнатной температуре. Полученную плазму отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов плазмы крови 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.

Тканевой (аутопсийный/биопсийный, плацента) материал

Материал отбирают чистым стерильным инструментом (например, пинцет) в стерильные пластиковые контейнеры объемом 50 мл с плотно закрывающимися крышками или пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов 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.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный контейнер объемом 50-60 мл. Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов. Если нет возможности исследовать материал в течение 1 суток после забора, то необходимо провести предобработку материала.

Допускается хранение образцов материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;

Не допускается замораживание материала!

Сперма

Получение спермы осуществляют в специальный сухой стерильный контейнер объемом 50–60 мл.

Допускается хранение образцов материала:

- 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 — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Амниотическая жидкость

Амниотическую жидкость собирают в сухую одноразовую стерильную пробирку объемом 2 мл в количестве не менее 1,0 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов материала:

- 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 — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание

материала.

Слюна

Перед получением слюны проводят трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов материала:

- 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 — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Комары

Собраный материал разбирают в лаборатории по видам, полу, местам и датам сбора и помещают в сухие чистые пробирки объемом 2,0 мл. При объединении комаров в пулы число особей в одном пуле не должно превышать 10.

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 70 °С или в сосуде Дюара с жидким азотом – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки из ротоглотки

Мазки забирают сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов 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 месяца;
- при температуре не выше минус 70 °С — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК

Образцы плазмы крови, мазки из ротоглотки, а также образцы прозрачной мочи не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки, если на исследование предоставлены образцы мутной мочи. В этом случае в пробирки объемом 1,5 мл отобрать по 1200 мкл мочи. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. 100 мкл полученной осветленной суспензии используют для экстракции РНК с использованием комплекта «РИБО-преп» или 1000 мкл осветленной суспензии используют для экстракции РНК с использованием комплекта «МАГНО-сорб». Если материал будет исследован позже, чем через 1 сутки после забора, необходимо перенести по 1100 мкл мочи в несколько пробирок объемом 1,5 мл, затем в них внести глицерин в объеме 10 % от объема пробы (120 мкл), перемешать на вортексе для равномерного распределения глицерина.

Допускается хранение образцов материала с глицерином:

- 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 тканевого (аутопсийного/биопсийного, плаценты) материала требуют предварительной подготовки. Для экстракции РНК берут 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани

готовят 10% суспензию на охлажденном стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для этого на 1 объем растёртой ткани добавляют 9 объемов физиологического раствора или фосфатного буфера. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. 50 мкл полученной осветленной 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.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы спермы требуют предварительной подготовки. В пробирки объемом 1,5 мл отобрать по 100 мкл спермы. Добавить в пробирки со спермой по 900 мкл реагента «МУКОЛИЗИН». Образцы тщательно перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) в течение 10 минут, тщательно перемешивая на вортексе каждые 2-3 минуты. Для экстракции РНК используют 50 мкл пробоподготовленной спермы.

Допускается хранение предварительно обработанной спермы до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Комары требуют предварительной подготовки.

Предварительно формируют пулы комаров (не более 50 особей). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 30 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

Для приготовления суспензий комаров используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора (например, TissueLyser LT) применяют следующие параметры для гомогенизации комаров: диаметр шариков – 5 мм, частота – 50 Гц/с, время гомогенизации 5 мин, объем буфера 700 мкл (пул из 25 комаров), объем буфера 1500 мкл (пул из 50 комаров).

Допускается хранение предварительно обработанных комаров до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы слюны/амниотической жидкости требуют предварительной подготовки. Перед экстракцией нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение слюны/амниотической жидкости, используя реагент «МУКОЛИЗИН». В емкость со слюной добавляют «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:3 (1 часть слюны к 3 частям «МУКОЛИЗИНА»), ориентируясь по градуировке емкости. В случае, если слюна очень густая, проводят ее разжижение реагентом «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:5. В процессе разжижения слюны (10 минут) емкость периодически встряхивают на вортексе. Для экстракции РНК используют 100 мкл разжиженной слюны и 50 мкл разжиженной амниотической жидкости.

Допускается хранение предварительно разжиженной слюны/амниотической жидкости до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции РНК и возможного

ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца ВКО ICZ-rec), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО ICZ-rec, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции РНК из плазмы крови, слюны, мочи, спермы, тканевого (аутопсийного/биопсийного, плаценты) материала, амниотической жидкости, комаров, мазков из ротоглотки в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «МАГНО-сорб» для экстракции РНК из мочи и плазмы крови в соответствии с инструкцией и методическими рекомендациями к используемому комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec** и положительного контрольного образца **ПКО ZIKV**.

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**,
(аутопсийный/биопсийный материал, плацента, сперма,
амниотическая жидкость – **50 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 ZIKV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» для 200 мкл образца:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec** и положительного контрольного образца **ПКО ZIKV**.

Объем **ВКО ICZ-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 ZIKV**.

Объем элюции – **50 мкл**; при использовании автоматических станций для экстракции РНК – **100 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» для 1000 мкл образца:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО ICZ-rec** и положительного контрольного образца **ПКО ZIKV**.

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

Объем исследуемого образца – **1000 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **ОКО 1000 мкл**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **990 мкл ОКО и 10 мкл ПКО ZIKV**.

Объем элюции – **50 мкл**; при использовании автоматических станций для экстракции РНК – **100 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 кДНК *Zika virus* с гибридизационно-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>ZIKV</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-Ревертаза (MMiv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
К+ <i>ZIKV</i> / ICZ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО <i>ZIKV</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО ICZ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	7 пробирок

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

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК 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.

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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 ZIKV, 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 ZIKV.** Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL ZIKV, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMiv), RT-G-mix-2,** 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+ ZIKV / ICZ**.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР** – в пробирку с реакционной смесью внести **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 ZIKV**.

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.

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. 3)

Таблица 3

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁴ и планшетного⁵ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	55	20 с	FAM, JOE	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить

⁴ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

⁵ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

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:

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	кДНК ВКО ICZ-rec	кДНК <i>Zika virus</i>

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 5

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

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

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

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование

соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР РНК в соответствии с табл. 6 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	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	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или 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 продуктами 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 продуктами 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. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL ZIKV, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv), RT-G-mix-2 хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL ZIKV хранить 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® *Zika virus-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