

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН
НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера

А.А. Тотолян

«01» апреля 2025 г.

Дата выдачи документа

«01» апреля 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов для выявления РНК вируса Гуанарито методом ОТ-ПЦР в
реальном времени (GTOV Amp PS)

Содержание

1. Общая информация	4
1.1 Назначение	4
1.2 Тип анализируемого образца.....	4
1.3 Целевой анализ	4
1.4 Требования в отношении подготовки пользователей	4
1.5 Специфическая патология	4
2. Характеристика Набора реагентов.....	5
2.1 Принцип метода.....	5
2.2 Состав Набора реагентов	6
2.4 Функциональные показатели Набора реагентов	7
2.4.1 Предел обнаружения	7
3. Меры предосторожности	7
3.1 Общие требования.....	7
3.2 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти негативные последствия для организма человека.....	9
4. Требуемое оборудование и материалы	9
4.1 Дополнительные реагенты для выделения РНК	9
4.2 Требуемое оборудование и материалы для проведения исследования.....	9
4.3 Сбор, подготовка и хранение исследуемых материалов	10
5. Проведение исследования	11
5.1 Подготовка материала к выделению нуклеиновых кислот	11
5.2 Условия проведения процедуры исследования.....	11
5.3 Экстракция РНК из исследуемого материала.....	11
5.4 Подготовка реакционной смеси для постановки ПЦР	11
Таблица 1. Реакционная смесь для ОТ- ПЦР	11
5.5 Работа с программным обеспечением амплификатора	12
Таблица 2. Программа амплификации	12
5.6 Анализ результатов ПЦР	12
Таблица 3. Значения Ct контрольных образцов.....	14
Таблица 4. Интерпретация результатов ПЦР исследования	14
6. Условия транспортирования Набора реагентов	15
7. Условия хранения Набора реагентов.....	15
8. Указания по безопасной утилизации.....	15
9. Гарантии производителя.....	16
10. Ремонт и техническое обслуживание	16
11. Объяснение используемых символов	16
Таблица 5. Объяснение символов, которые могут использоваться в маркировке	16
12. Контактная информация для обращений	17

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения «Набора реагентов для выявления РНК вируса Гуанарито методом ОТ-ПЦР в реальном времени GTOV Amp PS», разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Адрес: 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 233-20-92, факс: (812) 644-63-10

Электронный адрес: pasteur@pasteurorg.ru

Официальный веб-сайт: www.pasteurorg.ru

Список сокращений

Ct	от англ. «Cycle threshold», пороговый цикл
GTOV	от англ. «GuanariTO Virus», вирус Гуанарито
ВГЛ	Венесуэльская геморрагическая лихорадка
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
К-	отрицательный контроль ПЦР
К+	положительный контроль ПЦР
кДНК	комплементарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
Н/О	не определяется
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

1. Общая информация

1.1 Назначение

Набор реагентов GTOV Amp PS предназначен для качественного определения РНК вируса Гуанарито в препаратах нуклеиновых кислот.

1.2 Тип анализируемого образца

Основными видами исследуемого материала являются биологические образцы: плазма (с ЭДТА) и сыворотка крови человека.

1.3 Целевой анализ

Целевым анализом для проведения ОТ-ПЦР анализа является фрагмент гена, кодирующего белок L, РНК зависимой РНК полимеразы вируса Гуанарито.

1.4 Требования в отношении подготовки пользователей

Набор реагентов GTOV Amp PS предназначен только для профессионального применения.

К работе с Набором реагентов GTOV Amp PS допускаются специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической или научно-исследовательской лаборатории, в соответствии с национальным законодательством»

Организация лабораторной диагностики вируса Гуанарито осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с патогенными микроорганизмами. Лаборатории организаций, имеющие санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека той группы патогенности, которая соответствует вирусу Гуанарито и условия для работы (методом ПЦР или другими методами), могут организовывать работу по диагностике вируса Гуанарито, пользуясь зарегистрированными в установленном государственном порядке тест-системами в соответствии с инструкцией по применению. К работе с тест-системами для диагностики вируса Гуанарито в лабораториях организаций допускаются специалисты, имеющие санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний той группы патогенности, к которой относится вирус Гуанарито.

1.5 Специфическая патология

Вирус Гуанарито является новым зоонозным заболеванием, которое передается человеку от грызунов через укусы или царапины инфицированных особей, путём вдыхания аэрозолей вируса, а также через заражённую вирусом еду. Вирус Гуанарито вызывает венесуэльскую геморрагическую лихорадку (ВГЛ).

По прошествии инкубационного периода длительностью от 3 до 12 дней, на начальной стадии заболевания, наиболее распространенными симптомами ВГЛ являются резкий подъем температуры тела на фоне упадка сил, головная боль, упадок психической деятельности, миалгия, артралгия, кашель, боль в горле, тошнота, рвота, диарея, обезвоживание и сонливость. Отсутствие специфических симптомов приводит к затруднению постановки диагноза на данном этапе.

На этапе геморрагической фазы проявления заболевания наблюдаются носовое кровотечение, кровоточивость десен, кровь в стуле и потемнение стула. В следствие кровопотери могут возникать анемия, лейкопения и тромбоцитопения. В тяжелых случаях, составляющих 25-30%, наблюдаются геморрагический шок, артериальная гипотензия и/или гиповолемический шок, приводящие к геморрагическому застою, диффузному отеку легких, полиорганной недостаточности и летальному исходу. Коэффициент летальности составляет 60%.

Продолжительность заболевания в случаях, не связанных с летальным исходом, составляет около 10-14 дней. ВГЛ затрагивает все возрастные группы обоих полов. Самая высокая заболеваемость наблюдалась у лиц в возрасте от 15 до 44 лет.

В большинстве случаев, те кто выживает, обычно выздоравливают без осложнений. Однако, полное выздоровление требует длительной госпитализации.

Основной механизм передачи возбудителя – аэрогенный, контактный, фекально-оральный, пути передачи – воздушно-пылевой, контактно-бытовой, водный, пищевой.

2. Характеристика Набора реагентов

2.1 Принцип метода

Процесс тестирования на наличие РНК вируса Гуанарито с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени включает несколько этапов.

Предварительно РНК экстрагируется из образцов исследуемого материала в присутствии ВКО (необходимого для контроля качества выделения РНК). ВКО добавляют в каждый исследуемый образец, в том числе в ОКО и ПКО в соответствии с инструкцией набора для выделения нуклеиновых кислот. Просим обратить внимание, что набор GTOV Amp PS не содержит реактивов для выделения РНК, поэтому, для этого этапа необходимо использовать отдельные наборы или методики.

Принцип тестирования на наличие РНК вируса Гуанарито основывается на одноэтапной реакции, когда в одной пробирке проходит синтез кДНК на основе матрицы РНК при участии фермента ревертазы, в результате чего получается цепь кДНК, а далее следует амплификация целевых фрагментов в ходе ПЦР в режиме реального времени.

В состав реакционной смеси входят M-MuLV – RN ревертаза для синтеза кДНК на матрице РНК, специфичные праймеры для амплификации фрагмента кДНК вируса Гуанарито, HS-Taq ДНК-полимераза – фермент с 5'-экзонуклеазной активностью, который обеспечивает отщепление флуоресцентных меток зондов в процессе амплификации, что приводит к накоплению сигнала флюоресценции. Для детекции продуктов амплификации используются флуоресцентно-меченые зонды, которые связываются с комплементарными участками кДНК-мишеней. Флуоресцентно-меченые зонды с метками R6G для детекции искомого вируса, и с метками FAM для детекции ВКО.

Детекция сигнала флюоресценции регистрируется по двум каналам: HEX/Yellow – для кДНК вируса Гуанарито и FAM/Green – для детекции ВКО. Результаты анализируются исходя из значения Ct, которое отражает количество циклов ПЦР, необходимых для достижения порогового уровня флуоресценции. Чем ниже значение Ct, тем выше концентрация целевой РНК в образце.

Контроль качества обеспечивается наличием в составе набора реагентов ПКО GTOV и ОКО для контроля этапов выделения РНК, а также контроля аналитической специфичности – К+ GTOV и К- для контроля амплификации, ВКО для контроля влияния интерферирующих веществ и ингибиторов на этапах выделения РНК и амплификации.

2.2 Состав Набора реагентов

Набор реагентов GTOV Amp PS поставляется в двух боксах, каждый из которых требует соблюдения определенного температурного режима хранения. Состав и условия хранения для каждого бокса указаны ниже. Набор рассчитан на 100 реакций.

Бокс № 1

Реактив Amp 1B (1,25 мл) – 1 шт.;
Реактив Amp 2 GTOV (0,15 мл) – 1 шт.;
Реактив Amp 1RT (0,10 мл) – 1 шт.
К+ GTOV (0,10 мл) – 1 шт.;
К- (0,45 мл) – 1 шт.

Бокс № 2

ВКО (1,00 мл) – 1 шт.;
ПКО GTOV (1,00 мл) – 1 шт.;
ОКО (0,45 мл) – 1 шт.;

Инструкция по применению – 1 шт.
Копия паспорта – 1 шт.

Реагенты из Набора содержат следующие основные компоненты:

- 1) Реактив Amp 1B – буферный раствор для ОТ-ПЦР, содержащий дезоксинуклеозидтрифосфаты, стабилизаторы и усилители ферментов;

- 2) Реактив Amp 2 GTOV – смесь олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов комплементарных исследуемому фрагменту вируса Гуанарито и к ВКО;
- 3) Реактив Amp 1RT – буферный раствор, содержащий M-MuLV – RN ревертазу и HS-Taq ДНК-полимеразу;
- 4) K+ GTOV – положительный контроль этапа ПЦР, содержащий смесь двух плазмид - к исследуемому фрагменту вируса, и к ВКО ДНК;
- 5) K- – отрицательный контроль этапа ПЦР, содержащий воду для лабораторного анализа;
- 6) ВКО – внутренний контрольный образец этапа экстракции РНК, содержащий буфер с псевдовирусными частицами на основе фага MS2 с последовательностью РНК ВКО;
- 7) ПКО GTOV – положительный контрольный образец этапа экстракции РНК, содержащий буфер с псевдовирусными частицами на основе фага MS2, с фрагментом целевой последовательности РНК вируса Гуанарито;
- 8) ОКО – отрицательный контрольный образец этапа экстракции РНК, содержащий воду для лабораторного анализа.

2.4 Функциональные показатели Набора реагентов

2.4.1 Предел обнаружения

Установленный предел обнаружения составляет 1000 копий/мл РНК вируса Гуанарито.

3. Меры предосторожности

3.1 Общие требования

Вирус Гуанарито относится к патогенным биологическим агентам (ПБА).

Лаборатория, выполняющая работы с материалом, потенциально инфицированным вирусом Гуанарито, должна иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии санитарным правилам условий проведения работ с ПБА соответствующей группы патогенности.

К работе с материалом, потенциально инфицированным вирусом Гуанарито, а также другими ПБА, следует допускать только сотрудников, обученных методам амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим патогенные микроорганизмы, имеющих разрешение на работу с ПБА соответствующей группы патогенности и прошедших обучение на курсах профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- процесс работы с образцами, оборудованием и реагентами должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в зоне подготовки (№1), продолжать в зоне выделения НК (№2) и проведения ПЦР (№3). Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

- утилизировать образцы в соответствии с действующими государственными санитарными правилами и нормами, также и нормативными правовыми документами в сфере обращения с отходами;

- 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 дробного однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел 2.2 «Состав Набора реагентов»);

- применять набор строго по назначению в соответствии с инструкцией по применению;

- все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования действующих государственных санитарных правил и норм;

- не использовать набор реагентов, если при первом использовании заводская упаковка вскрыта или повреждена, 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 медицинские одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, ламинарные боксы во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводить только в перчатках для исключения контакта с организмом человека (пользователя);

– избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью;

– информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу к производителю;

– Набор реагентов GTOV Amp PS содержит азид натрия в концентрации 0,05% (в качестве консерванта), являющийся токсичным веществом. Отходы, образующиеся в результате применения пользователями Набора реагентов по назначению, установленному производителем, не являются токсически опасными вследствие малой концентрации азидов натрия, и относятся к медицинским отходам категории В не содержащим токсичных веществ 1 или 2 классов опасности. Для безопасной утилизации неиспользованного Набора и образующихся после использования Набора отходов необходимо следовать местным требованиям по утилизации совместно с рекомендациями и данными, представленными в паспорте безопасности Набора. Наиболее актуальную информацию об опасности см. в паспорте безопасности Набора. Паспорт безопасности предоставляется дополнительно по запросу потребителя.

3.2 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти негативные последствия для организма человека.

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

4. Требуемое оборудование и материалы

4.1 Дополнительные реагенты для выделения РНК

Для выделения РНК рекомендуется использовать следующие наборы в соответствии с их инструкцией:

– «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, РУ № ФСР 2008/03147 от 24.05.2024 г.;

– «Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «МАГНО-сорб» по ТУ 9398-106-01897593-2012», РУ № ФСР 2010/07265 от 19.12.2024 г.;

– «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала «НУКЛЕО-преп PS» по ТУ 21.20.23-035-01967164-2020, РУ № РЗН 2021/14830 от 20.07.21 г.

4.2 Требуемое оборудование и материалы для проведения исследования

– программируемый амплификатор (термоциклер) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени с обязательным наличием каналов

детекции флуоресценции FAM/Green и HEX/Yellow. Валидированы для совместного применения с Набором реагентов: Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) или CFX384 (Optical Reaction Module CFX384), (Bio-Rad Laboratories Inc. («Био-Рад Лабораториз Инк»), США) планшетного типа или прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, с принадлежностями (Qiagen («КИАГЕН ГмбХ») Германия;

- бокс абактериальной воздушной среды для работы с РНК-пробами;
- высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12 с принадлежностями, (ООО БИОСАН (BioSan), Латвия);
- лабораторные дозаторы пипеточные механические переменного объема;
- наконечники универсальные с фильтром для лабораторных дозаторов, объемом до 10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- пробирки, объемом от 0,5 мл до 2,0 мл, пробирки объемом от 0,2 мл для постановки ПЦР, бесцветные;
- центрифуга-вортекс со скоростью вращения 1500–3000 об/мин;
- холодильник, поддерживающий температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С;
- морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 22 °С до минус 16 С;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки медицинские одноразовые неопудренные;
- Вода для лабораторного анализа по спецификации «Вода для лабораторного анализа», СПЦ-ОПП-С002.

Допускается применение других материалов и оборудования, эквивалентных по техническим характеристикам и квалификации.

4.3 Сбор, подготовка и хранение исследуемых материалов

Основными видами исследуемого материала являются препараты нуклеиновых кислот, полученные из биологических образцов: плазмы (с ЭДТА) и сыворотки крови человека.

Все действия по подготовке проб, должны проводиться в соответствии с положениями, изложенными в разделе 3 «Меры предосторожности». Сбор, подготовка, транспортирование, хранение, образцов исследуемого материала осуществляется специально обученным персоналом в соответствии с действующими нормативно-правовыми документами: санитарными правилами и нормами, методическими указаниями, рекомендациями для соответствующих видов образцов.

5. Проведение исследования

5.1 Подготовка материала к выделению нуклеиновых кислот

Выделение нуклеиновых кислот проводят в соответствии с инструкциями по применению для наборов реагентов для выделения РНК, рекомендованными для совместного применения с данным набором реагентов (см. раздел 4 «Требуемое дополнительное оборудование и материалы»).

5.2 Условия проведения процедуры исследования

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Все работы проводят при температуре от 20 °С до 28 °С, относительной влажности от 15 до 75 %. Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности при условии соблюдения мер изложенных в разделе 3. «Меры предосторожности».

5.3 Экстракция РНК из исследуемого материала

Подготовить и промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с количеством исследуемых проб и две дополнительные микропробирки для ОКО и ПКО. Внести в каждую подготовленную пробирку ВКО в объеме 10 мкл. В пробирки, предназначенные для исследуемых проб, ПКО и ОКО внести по 90 мкл исследуемого образца, ПКО, ОКО, соответственно. Далее необходимо проводить процедуру выделения РНК согласно инструкции к применяемому набору. Полученные образцы РНК хранят в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

5.4 Подготовка реакционной смеси для постановки ПЦР

Подготовка реакционной смеси для ОТ- ПЦР должна проводиться в зоне № 3 в боксе абактериальной воздушной среды. Реагенты набора следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР!

Порядок работы:

1. Разморозить Реактив Amp 1RT, Amp 1B, Реактив Amp 2 GTOV, K+ GTOV и K- из Бокса № 1. Перемешать содержимое пробирок, осадить капли на вортексе.
2. Подготовить в одной чистой пробирке общую реакционную смесь в соответствии с количеством исследуемых образцов согласно таблице 1 и с учетом четырех контрольных образцов (ПКО, ОКО, K+, K-) и одного дополнительного образца с учетом погрешности пипетирования. Перемешать содержимое пробирки, осадить капли на вортексе.

Таблица 1. Реакционная смесь для ОТ- ПЦР

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл	Объем на 100 реакций, мкл
Реактив Amp 1B	12,5	1250

Реактив Amp 2 GTOV	1,5	150
Реактив Amp 1RT	1	100

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации РНК исследуемых и контрольных образцов.
4. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной общей реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В пробирки внести по 10 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов. В пробирки, предназначенные для контрольных образцов вносят по 10 мкл соответствующих контролей (ПКО, ОКО, К+, К-). Конечный объем реакции с учетом добавленного образца должен составлять 25 мкл. На пробирки не наносят надписи, чтобы исключить влияние на детекцию флуоресценции.
6. Закрыть крышки пробирок для ПЦР, перемешать содержимое пробирок, осадить капли на вортексе.
7. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

5.5 Работа с программным обеспечением амплификатора

Запустить программное обеспечение амплификатора. Внести программу протокола амплификации в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2. Программа амплификации

Этап	Температура, °C	Время	Количество циклов	Канал детекции
Обратная транскрипция	50	15 мин	1	-
Предварительная денатурация	95	5 мин	1	-
Денатурация	95	10 с	40	-
Отжиг праймеров и элонгация	55	20 с		FAM/Green и HEX/Yellow

Создать разметку в соответствии с установленными пробирками блока амплификатора, выбрать каналы детекции FAM/Green (для детекции ВКО) и HEX/Yellow (для детекции целевой фрагмент РНК вируса Гуанарито), запустить программу амплификации.

5.6 Анализ результатов ПЦР

При использовании приборов роторного типа для анализа результатов рекомендуется использовать следующие настройки: для каналов Green и Yellow установить режим динамического фона (**Dynamic tube**) и коррекции уклона (**Slope Correction**), в меню устранение выбросов (**Outlier Removal**) выставить значение порога фона отрицательных

проб (**NTC Threshold**) 0-10%, в меню расчета порогового цикла (**Ct calculation**) установить пороговое значение (**Threshold**) для Green в 0,05-0,10 единицы и для Yellow в 0,10 единицы. В случае, если кривые флуоресценции не соответствуют экспоненциальному росту (не имеют S-образный вид), допускается увеличение значения порога фона отрицательных (**NTC Threshold**) проб до 20%.

При использовании приборов планшетного типа для каналов FAM и HEX в разделе меню настройки (**Settings**), подменю Настройки базовой линии (**Baseline settings**) установить режим вычитания базовой линии (**Baseline subtracted**) и (**Apply fluorescence drift correction**). Пороговые значения автоматического определения (**Auto-calculated**) следует установить в меню пороговых уровней базовой линии (**Baseline threshold**), в пунктах «базовые циклы» (**Baseline cycles**) и «один пороговый цикл» (**Single Threshold**) либо в том же меню выставить вручную. В обоих случаях пороговое значение должно соответствовать 5-10% от максимального уровня флуоресценции образцов K⁺ на последнем цикле ПЦР.

На следующем этапе в программном обеспечении приборов анализируют кривые накопления сигнала флуоресценции графики накопления кДНК по следующим параметрам:

- график накопления флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- кривая флуоресценции по каналу пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

Для кривых, соответствующих этим параметрам, определяют пороговый цикл Ct – цикл ПЦР, при котором флуоресценция по данному каналу для данного образца достигла порогового значения флуоресценции.

Результаты проведенного ПЦР исследования так же оценивают по следующим критериям приемлемости:

- в ходе амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM/Green и HEX/Yellow в пробирках с ПКО GTOV и K⁺ GTOV; значения Ct для этих образцов соответствует границам из таблицы 3;
- в ходе амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM/Green и HEX/Yellow в пробирке с K⁻;
- в ходе амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM/Green с отсутствием роста уровня флуоресценции по каналу HEX/Yellow в пробирке с ОКО, и полученные значения порогового цикла Ct соответствуют границам, указанным в таблице 3.

Если ОТ-ПЦР исследование отвечает всем вышеперечисленным критериям, то его результаты считаются приемлемыми для применения. В таком случае заключение о наличии, либо отсутствии в анализируемом клиническом образце вируса Гуанарито делается в соответствии с таблицей 4.

Если результаты ОТ-ПЦР исследования не соответствуют одному из указанных критериев, необходимо провести повторное исследование всех образцов, начиная с выделения РНК с принятием мер по устранению контаминации в ПЦР-лаборатории.

Таблица 3. Значения Ct контрольных образцов

Контрольный образец	Пороговый цикл ПЦР (Ct)			
	Канал детекции FAM/Green		Канал детекции HEX/Yellow	
	Прибор роторного типа	Прибор планшетного типа	Прибор роторного типа	Прибор планшетного типа
ПКО GTOV	≤ 35	≤ 35	≤ 33	≤ 33
ОКО	≤ 35	≤ 35	Н/О	Н/О
К+ GTOV	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30
К-	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О

Таблица 4. Интерпретация результатов ПЦР исследования

Анализируемый параметр исследуемых проб	Пороговый цикл ПЦР (Ct)			
	Канал FAM/Green		Канал HEX/Yellow	
	Прибор роторного типа	Прибор планшетного типа	Прибор роторного типа	Прибор планшетного типа
Образец положителен на наличие РНК вируса Гуанарито	≤ 35	≤ 35	≤ 37	≤ 37
Образец отрицателен на наличие РНК вируса Гуанарито	≤ 35	≤ 35	Н/О	Н/О
Результат сомнительный	> 35 или Н/О	> 35 или Н/О	> 37 или Н/О	> 37 или Н/О

При значениях Ct, полученных при проведении испытания, за пределами интервала, указанного в таблицах 3 и 4, следует провести повторное испытание. Если при повторном проведении испытания, полученные результаты находятся за пределами указанного интервала, то следует считать, что набор реагентов ненадлежащего качества и данный набор не может быть использован для проведения анализа. При значениях Ct интерпретируемым согласно указаниям в таблице 4 как «результат сомнительный», следует

провести повторный анализ с образцом, начиная с этапа выделения РНК. При невозможности повторного выделения РНК следует провести повторный анализ, начиная с этапа ПЦР. При повторном сомнительном или отрицательном результате окончательный результат следует интерпретировать как отрицательный. При положительном результате повторного анализа его следует интерпретировать как положительный.

6. Условия транспортирования Набора реагентов

Транспортировать набор реагентов следует всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С в течение не более 5 суток. Замораживание набора при транспортировании не допускается.

Транспортирование наборов реагентов должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

При транспортировании необходимо защищать упаковку от воздействия влаги и солнечного света, соблюдать осторожность как с хрупким грузом, соблюдать ориентацию вверх согласно указанию знака на транспортной упаковке.

Набор реагентов, транспортировавшийся с нарушением температурного режима, использовать запрещается, он подлежит утилизации согласно указаниям раздела 8 «Указания по безопасной утилизации» как пришедший в негодность.

7. Условия хранения Набора реагентов

Компоненты набора реагентов до и после вскрытия должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя набора в течение всего срока годности в соответствии со следующими температурными режимами:

Компоненты бокса №1: Реактив Amp 1B, Реактив Amp 2 GTOV, Реактив 1RT, K+ GTOV, K- должны храниться при температуре от минус 22°С до минус 18°С, при этом, для компонентов Реактив Amp 1B допускается не более 10 циклов замораживания-размораживания, для Реактива Amp 2 GTOV и K+ GTOV не более 4 циклов;

Компоненты бокса №2: ПКО GTOV, ВКО, ОКО должны храниться при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С.

Холодильники и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Набор реагентов GTOV Amp PS, хранившийся с нарушением температурного режима, использовать запрещается, его необходимо утилизировать как пришедший в негодность в соответствии с указаниями раздела 8 «Указания по безопасной утилизации».

8. Указания по безопасной утилизации

Наборы реагентов GTOV Amp PS, пришедшие в непригодность в связи с истечением срока годности на складе производителя, не выдержавшие контроль качества, забракованные, относятся к отходам производства класса В и подлежат утилизации в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами, также нормативными документами в сфере обращения с отходами.

Отходы, образующиеся в результате применения Набора реагентов пользователями по назначению, установленному производителем, относятся к медицинским отходам категории В не содержащим токсичных веществ 1 или 2 классов опасности.

Медицинские отходы подлежат сбору, обезвреживанию, размещению, хранению, транспортировке, учету и утилизации в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами.

9. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Срок годности набора – 12 месяцев от даты изготовления.

10. Ремонт и техническое обслуживание

Набор реагентов GTOV Amp PS не подлежит ремонту и техническому обслуживанию.

11. Объяснение используемых символов

Таблица 5. Объяснение символов, которые могут использоваться в маркировке

Символ	Название символа	Значение символа
	Изготовитель	Рядом с символом указаны наименование и адрес изготовителя Набора реагентов
	Дата изготовления	Рядом с символом указана дата изготовления Набора реагентов

	Использовать до, срок годности	Рядом с символом указана дата, после которой Набора реагентов не должен применяться
	Код партии	Рядом с символом указан код партии Набора реагентов, установленный производителем
	Предел температуры	Рядом с верхними и нижними горизонтальными линиями указаны границы температурного диапазона, в пределах которого Набор реагентов может надежно сохраняться
	Обратитесь к инструкции по применению	Указывает на необходимость для пользователя ознакомиться с инструкцией по применению
	Содержимого достаточно для проведения n тестов	Рядом с символом указано количество тестов, которые могут быть выполнены с использованием Набора реагентов
	Не допускать воздействия солнечного света	Указывает, что Набор реагентов необходимо защищать от воздействия солнечного света и держать вдали от источников тепла
	Беречь от влаги	Указывает на необходимость защиты груза от воздействия влаги
	Верх	Указывает правильное вертикальное положение груза
	Хрупкое. Осторожно	Указывает на необходимость осторожного обращения с грузом

12. Контактная информация для обращений

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов для выявления РНК вируса Гуанарито методом ПЦР в реальном времени (GTOV Amp PS), следует обращаться к предприятию-изготовителю ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по адресу: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, телефон (812) 233 20 92, факс (812) 644 63 10, эл. адрес: pasteur@pasteurorg.ru, интернет-сайт <https://www.pasteurorg.ru>.