

УТВЕРЖДАЮ

КОПИЯ

Генеральный директор

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора



Р.А. Максютов

«17» ноября 2017г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт методом ОТ-ПЦР

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

по ТУ 9398-056-05664012-2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВЛДР	– вирус лихорадки долины Рифт
ОТ	– обратная транскрипция
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РВ	– гибридизационно-флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
кДНК	– комплементарная ДНК, получаемая в реакции ОТ на матрице РНК
ПКО	– положительный контрольный образец экстракции РНК и ОТ-ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции РНК и ОТ-ПЦР
ВКО	– внутренний контрольный образец

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» по ТУ 9398-056-05664012-2016.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» предназначен для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт (ВЛДР) в биологических образцах (плазме, сыворотке крови и секционном материале) методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией фрагмента кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и гибридизационно-флуоресцентной детекцией продукта реакции в режиме «реального времени» (РВ).

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика лихорадки долины Рифт, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования. Набор может быть использован в лабораториях специализированных противозидемических бригад Роспотребнадзора (без накопления возбудителя вирусологическими методами), а также в изолированных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства Обороны.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» состоит из 7 реагентов:

№	Реагент	Описание	Объём, мл	Количество
1	HS Taq полимераза, P-1	Опалесцирующая бесцветная жидкость	0,012	1 микропробирка
2	M-MuLV ревертаза, P-2	Опалесцирующая бесцветная жидкость	0,012	1 микропробирка
3	ВЛДР-смесь 1, P-3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 микропробирка
4	ВЛДР-смесь 2, P-4	Прозрачная жидкость розового цвета	0,3	1 микропробирка
5	ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО), P-5	Прозрачная бесцветная жидкость*	0,05	2 микропробирки
6	Отрицательный контрольный образец (ОКО), P-6	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 микропробирки
7	Внутренний контрольный образец (ВКО), P-7	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 микропробирки

*При хранении раствора ПКО при температуре от минус 16 до минус 20 °С возможно образование растворимого кристаллического осадка.

HS Taq полимераза (P-1) расфасована по 0,012 мл в микропробирку с основанием, вместимостью 0,5 мл, с закручивающейся крышкой, состав: Hot Start Taq-ДНК-полимераза в буферном растворе.

M-MuLV ревертаза (P-2) расфасована по 0,012 мл в микропробирку с основанием, вместимостью 0,5 мл, с закручивающейся крышкой, состав: M-MuLV обратная транскриптаза в буферном растворе.

ВЛДР-смесь 1 (P-3) расфасована по 0,6 мл в микропробирку с основанием вместимостью 1,5 мл с закручивающейся крышкой, состав: раствор реакционного буфера (10x) для Hot Start Taq-ДНК-полимеразы, хлорид магния, вода очищенная.

ВЛДР-смесь 2 (P-4) расфасована по 0,3 мл в микропробирку с основанием вместимостью 1,5 мл с закручивающейся крышкой, состав: раствор 4-х дезоксинуклеозидтрифосфатов, олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов.

Положительный контрольный образец, ПКО (P-5), расфасован по 0,05 мл в 2 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с закручивающейся крышкой, состав: инактивированная культуральная жидкость, содержащая музейный штамм RVF 2002/09-ПЧ вируса лихорадки долины Рифт в лизирующем растворе.

Отрицательный контрольный образец, ОКО (P-6), расфасован по 1,0 мл в 2 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с закручивающейся крышкой, состав: раствор ДНК фага.

Внутренний контрольный образец, ВКО (Р-7), расфасован по 0,3 мл в 2 микропробирки с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, состав: неспецифичный к ВЛДР ампликон или рекомбинантная бактериальная плазмида, содержащая неспецифичную к ВЛДР вставку.

Примечание: ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 55 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на проведение анализа 60 проб, включая контрольные образцы, и состоит из комплекта реагентов для ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». **Реагенты для выделения РНК из биологического материала в состав набора не входят!** Для выделения РНК из биологического материала необходимо дополнительно к набору реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» использовать комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (ФСР 2008/03147 от 24.03.2017 г.) или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке.

2.3 Метод исследования

Выявление РНК вируса лихорадки долины Рифт включает две стадии. На первой стадии после первичной подготовки проб проводят выделение РНК из биологических образцов. Экстракция РНК проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), обеспечивающего контроль процедуры анализа каждой индивидуальной пробы. На второй стадии проводят обратную транскрипцию вирусной РНК с помощью фермента M-MuLV ревертазы и последующую амплификацию фрагмента кДНК в полимеразной цепной реакции при помощи олигонуклеотидных праймеров и фермента HS Taq полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит непосредственно в ходе ПЦР благодаря применению флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда, гибридизующегося с продуктом реакции (ампликоном) и обеспечивающего дополнительную специфичность метода. Интенсивность флуоресценции возрастает в ходе ПЦР пропорционально накоплению ампликонов, а динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Постановка ОТ-ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «CFX-96» (BioRad, США), «Rotor-Gene 3000/6000» (Corbett Research, Австралия) и «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5 настоящей инструкции), имеющих каналы детекции флуоресценции FAM/Green и HEX/Yellow.

2.4 Ограничения метода

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

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе экстракции РНК либо проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательного контрольного образца экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ (ОКО) (пп. 7.2 и 8 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность экстракции РНК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего и положительного контрольных образцов экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ (ВКО и ПКО) (пп. 7.2 и 8 настоящей инструкции).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базах: клинико-диагностическая лаборатория ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва) и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирская обл., рабочий поселок Кольцово) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность набора реагентов составляет 1×10^2 копий кДНК вируса лихорадки долины Рифт в 25 мкл реакционной смеси.

Для достижения показателей чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность — ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов РНК вируса лихорадки долины Рифт, вируса лихорадки Западного Нила, вируса желтой лихорадки, вируса денге, вируса Зика, вируса чикунгунья, вируса вепесуэльского энцефаломиеелита лошадей, вируса диареи крупного рогатого скота, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита, вируса уличного бешенства, ДНК бактериофагов лямбда и T4, ДНК человека и грызунов отсутствовали.

3.2 Диагностические характеристики

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – при исследовании 200 положительных проб, содержащих РНК вируса лихорадки долины Рифт (100 проб на 2-х сериях набора), при наличии в 25 мкл реакционной смеси 1×10^2 копий кДНК вируса, был получен положительный результат в 200 случаях.

Диагностическая чувствительность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 200 отрицательных проб, не содержащих РНК вируса лихорадки долины Рифт 100 проб на 2-х сериях набора, отрицательный ответ в ПЦР получен в 200 случаях.

Диагностическая специфичность – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусом лихорадки долины Рифт (II группа патогенности), проводят с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» 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». Утилизация тест-систем с истекшим сроком годности и отработанных препаратов должна соответствовать требованиям СанПиН 2.1.7.2790–10.

Для предотвращения контаминации анализируемых проб при проведении работ с использованием ПЦР пользователям диагностических наборов реагентов необходимо выполнять следующие требования.

1. Разделение лаборатории на зоны (помещения) для каждой из стадий ПЦР-анализа:

ЗОНА 1 для подготовки проб;

ЗОНА 2 для экстракции нуклеиновых кислот;

ЗОНА 3 для приготовления реакционных смесей и постановки ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции.

2. Каждое из помещений лаборатории должно иметь свой набор реагентов, дозаторов, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов, обуви и перчаток, уборочного инвентаря.
3. Микропробирки и наконечники для дозаторов следует использовать однократно. Необходимо менять наконечники при переходе от одной пробы к другой с целью

предотвращения перекрестной контаминации в процессе экстракции нуклеиновых кислот или при внесении реагентов в реакционную смесь.

4. При постановке анализа следует обязательно применять прилагаемые к набору отрицательный, положительный и внутренний контрольные образцы.
5. Рабочие зоны (помещения) лаборатории должны подвергаться ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с требованиями руководства Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
6. Использованные наконечники для дозаторов, микропробирки, другие одноразовые материалы следует подвергать обработке дезинфицирующими средствами, вызывающими деградацию ДНК (например, 0,2 % раствор ДП-2Т) с последующей утилизацией.
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.

Потенциальный риск применения набора – класс 2 б (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности, не имеющих противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, не пить и не курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ ЗОНА 1 (подготовки проб):

1. Ламинарный бокс (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип B2).
2. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 16 до минус 20 °С.
3. Набор дозаторов переменного объема (например, «Ленпинет», Россия).
4. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12000 g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
6. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Спирт этиловый, 96 %.
9. Физиологический раствор (0,15 М раствор хлорида натрия).
10. Стерильные фарфоровые чашки и пестики.
11. Одноразовые микропробирки с завинчивающейся или плотно закрывающейся крышечкой объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
12. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
13. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
14. Отдельный халат, обувь и одноразовые перчатки.
15. Емкость с дезинфицирующим раствором (например, 0,2 % раствор ДЦ-2Г).

ЗОНА 2 (экстракции нуклеиновых кислот):

1. Ламинарный бокс (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип B2).
2. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 16 до минус 20 °С.
3. Набор дозаторов переменного объема (например, «Ленпинет», Россия).
4. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12000 g (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала. Рекомендуется набор «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
9. Одноразовые микропробирки с закручивающейся или плотно закрывающейся крышечкой объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
10. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 200 и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
12. Отдельный халат, обувь и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором (например, 0,2 % раствор ДП-2Т).

ЗОНА 3 (приготовления реакционных смесей и постановки ОТ-ПЦР):

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: «CFX96» («Bio-Rad», США), «Rotor-Gene 3000/6000» (Corbett Research, Австралия) или «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия). Возможно использование их аналогов, имеющих каналы детекции флуоресценции FAM/Green и HEX/Yellow.
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия) или ламинарный бокс (рекомендуется для снижения риска контаминации и появления ложноположительных результатов).
3. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 16 до минус 20 °С.
4. Набор дозаторов переменного объема (например, «Ленпинет», Россия).
5. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Одноразовые микропробирки, стрипы или планшеты (например, «Axygen», США), рекомендуемые производителем амплификатора.
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 20 и до 200 мкл (например, «Axygen», США).
8. Штативы для микропробирок/стрипов и наконечников (например, «Axygen», США).
9. Отдельный халат, обувь и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором (например, 0,2 % раствор ДП-2Т).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность вирусом лихорадки долины Рифт, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР».

6.1 Тип исследуемых образцов

Исследованию подлежат препараты нуклеиновых кислот, приготовленные (с

соблюдением требований МУ 1.3.2569-09) из плазмы, сыворотки крови и секционного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Порядок работы:

■ Получение плазмы крови

Взятие цельной венозной крови следует проводить утром натощак. Для предотвращения свертывания отобрать кровь в вакуумные пробирки с раствором ЭДТА либо цитрата натрия строго до риски, указанной на этикетке пробирки. Используемые антикоагулянты (гепарин, ЭДТА, цитрат натрия) не влияют на результаты анализа.

Внимание! Использовать для забора крови пробирки с гепарином недопустимо!

Сразу после забора крови пробирки плавно перевернуть не менее трех раз, не допуская пенообразования. Центрифугировать пробирки с цельной кровью в течение 10 мин при 3000 g, затем отобрать в отдельные пробирки надосадочную жидкость – плазму крови. Для экстракции РНК использовать 100 мкл плазмы.

■ Получение сыворотки крови

Взятие цельной венозной крови следует проводить утром натощак в вакуумные пробирки, не содержащие антикоагулянтов. По окончании забора крови поместить пробирки в вертикальный штатив, отстаивать кровь при температуре 15-20 °С в течение 30 минут (до полного образования сгустка). После образования сгустка центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 1000-1200 g (максимально до 1500 g), затем отобрать в отдельные пробирки надосадочную жидкость – сыворотку крови. Для экстракции РНК использовать 100 мкл сыворотки.

■ Приготовление суспензий секционного материала

Образцы секционного материала (фрагменты тканей мозга, печени) растереть пестиком в стерильных фарфоровых чашках. Для получения 10 % суспензий перенести в стерильные пробирки по 1,0 г гомогенизированных образцов тканей и добавить по 9,0 мл 0,15 М раствора хлорида натрия. Плавно перевернуть закрытые пробирки не менее трех раз. Для экстракции РНК использовать по 100 мкл суспензий.

6.3 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых проб

Допускается хранение биологического материала до проведения исследования в течение 1 суток при температуре от 2 до 8 °С или в течение 1 недели при температуре от минус 16 до минус 20 °С, далее при минус 60 °С и ниже (до года).

При замораживании биологического материала его транспортировка также должна проводиться в замороженном состоянии. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов.

6.4 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса лихорадки долины Рифт, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II группы патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и

действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал утилизируют в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Экстракция РНК

Для экстракции РНК вируса лихорадки долины Рифт из биологического материала рекомендуется использовать комплект реагентов «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (ФСР 2008/03147 от 24.03.2017 г.) или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке. В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать положительный контрольный образец (ПКО, Р-5) и отрицательный контрольный образец (ОКО, Р-6) из состава набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛЦР», которые обязательно анализируются в ОТ-ПЦР-РВ. Применение ПКО (Р-5) позволяет контролировать стабильность реагентов, используемых для экстракции нуклеиновых кислот, и компонентов набора, предназначенных для проведения ОТ-ПЦР-РВ. Назначение ОКО (Р-6) – контроль возможной контаминации на этапах экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР-РВ.

Для контроля надлежащего прохождения этапов экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР-РВ в индивидуальных пробах используют внутренний контрольный образец (ВКО, Р-7) из состава набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛЦР».

Порядок работы:

1. Прогреть раствор для лизиса из набора «РИБО-преп» в термостате при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов согласно инструкции производителя.
2. Отобрать необходимое количество пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками, включая пробирки для отрицательного (ОКО) и положительного (ПКО) контрольных образцов. Промаркировать пробирки.
3. Внести в каждую пробирку по 10 мкл Р-7.
4. Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса.
5. В пробирки с Р-7 и раствором для лизиса внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером.
6. В пробирку отрицательного контрольного образца внести 100 мкл Р-6.
7. Перемешать раствор Р-5 на вортексе до полного растворения осадка, осадить капли с крышки и стенок пробирки кратковременным центрифугированием и внести в пробирку положительного контрольного образца 10 мкл Р-5 и 90 мкл Р-6.
8. Дальнейшие операции по экстракции РНК проводить согласно инструкции к набору реагентов «РИБО-преп», начиная с п. 4 раздела «Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов»: «Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате».

7.2 Постановка ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией

(общий объем одной реакции – 25 мкл, включая объем РНК-пробы – 10 мкл)

Порядок работы:

1. Приготовить необходимое количество микропробирок/стринов или планшет (далее «микропробирки») по числу тестируемых проб, включая полученные на стадии экстракции отрицательный и ВЛДР-положительный контроли. Для внесения в пробирки реагентов, проб и контрольных образцов используют одноразовые наконечники с фильтрами. **Внимание!** При использовании амплификатора планшетного типа недопустимо нанесение маркировки на крышки микропробирок.
2. Приготовить реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешать в отдельной пробирке Р-3, Р-4, Р-1 и Р-2 из расчета на *каждую* реакцию:
 - 10 мкл Р-3;
 - 5 мкл Р-4;
 - 0,2 мкл Р-1;
 - 0,2 мкл Р-2.
3. Внести в каждую микропробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.
4. Используя одноразовые наконечники с аэрозольным барьером, внести в микропробирки с реакционной смесью по 10 мкл РНК-проб, включая прошедшие стадию экстракции РНК отрицательный и положительный контрольные образцы (ОКО и ПКО).
5. Поместить микропробирки в амплификатор.
6. Выбрать объем реакционной смеси (25 мкл). Выбрать канал FAM/Green для детекции амплификации кДНК вируса лихорадки долины Рифт. Выбрать канал HEX/Yellow для детекции амплификации внутреннего контрольного образца (ВКО).
7. Запрограммировать положение микропробирок с исследуемыми пробами, положительными и отрицательными контролями согласно руководству по эксплуатации прибора.
8. Провести ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени» согласно следующему протоколу:

Температура, °С	Время	Каналы детекции флуоресценции	Количество циклов
45	30 мин	-	1
94	3 мин	-	1
94	10 с	-	5
55	30 с	-	
72	20 с	-	
94	10 с	-	35
55	30 с	FAM/Green, HEX/Yellow	
72	20 с	-	

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анализа результатов используют программное обеспечение амплификатора. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

При использовании амплификаторов «Rotor-Gene 3000/6000» (Corbett Research, Австралия)

или «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) установить следующие параметры: в меню *Analysis/Анализ* выбрать режим анализа *Quantitation/Количественный* и включить опции *Dynamic tube/Динамический фон* и *Slope Correct/Коррекция уклона*; в меню, *Outlier Removal/Устранение выбросов* установить *NTC threshold/Порог Фона* равным 10 %; в меню *CT Calculation/Вычисление CT* установить *Threshold/Порог* равным 0,03 по каналам FAM и HEX.

При использовании амплификатора «CFX-96» (BioRad, США) в меню *Settings* выбрать: *Cq Determination Mode – Single Threshold; Baseline Setting – Baseline Subtracted Curve Fit*.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривых флуоресценции образцов с пороговыми линиями, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе таблицы результатов программы амплификатора. Пять первых регистрируемых циклов амплификации при анализе не учитывают. Для достоверной интерпретации результатов следует учитывать значения «Ct», полученные для положительного, отрицательного и внутреннего контролей:

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		FAM/Green (канал кДНК ВЛДР)	HEX/Yellow (канал ВКО)
ПКО	Экстракция РНК и ОТ-ПЦР	< 25	< 25
ОКО	Экстракция РНК и ОТ-ПЦР	нет или > 32	< 25

Порядок учёта результатов:

- Анализируемый образец считают *отрицательным*, т.е. не содержащим РНК ВЛДР, если значение «Ct» по каналу FAM (канал кДНК ВЛДР) больше 32 или не определяется.

Исключениями являются случаи:

- если для образца, показавшего отрицательный результат, значение «Ct» для внутреннего контрольного образца (ВКО) по каналу HEX превышает 25 или не определяется, то результат анализа считается недостоверным, необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа экстракции;
- если значение «Ct» для положительного контрольного образца (ПКО) по каналу FAM превышает 25 или не определяется, то результаты анализа по всем образцам постановочной серии, показавшим отрицательный результат, считаются недостоверными, необходимо повторить анализ этих образцов, начиная с этапа экстракции.
- Анализируемый образец считают *положительным*, т.е. содержащим РНК ВЛДР, когда кривая накопления флуоресценции имеет характерную экспоненциальную фазу роста и пересекает пороговую линию. При этом значение «Ct» по каналу FAM должно быть не больше

32. Амплитуда сигнала не имеет значения. Исключением является случай, когда для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналу FAM значение «Ст» меньше или равно 32. Это свидетельствует о наличии контаминации реагентов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам постановочной серии, для которых был получен положительный результат, считаются недостоверными. Необходимо принять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ этих образцов, начиная с этапа экстракции.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» хранить в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с ТУ 9398-056-05664012-2016 при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С. Следует избегать длительного размораживания реагентов. Срок годности вскрытых компонентов изделия – в течение срока годности серии набора.

9.2 Условия транспортирования набора

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» транспортировать в соответствии с ТУ 9398-056-05664012-2016 при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере не более трех суток.

9.3 Срок годности набора

Срок годности набора – 12 месяцев со дня изготовления. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, Россия, Новосибирская область, рабочий поселок Кольцово, тел. (383) 336-60-10, факс (383) 336-74-09, e-mail: vector@vector.nsc.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора

реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Зав. отделом разработки средств ПЦР диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, д.б.н.

Н.А. Нетесова

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, к.б.н.

М.П. Богрянцева

СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

" 17 11 2017 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ МИ «Набор реагентов для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» по ТУ 9398-056-05664012-2016» на базе (ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

Было использовано 200 положительных проб (100 проб на 2-х сериях набора), содержащих кДНК вируса лихорадки долины Рифт в концентрации не менее 1×10^2 копий в 25 мкл реакционной смеси, и 200 отрицательных проб (100 проб на 2-х сериях набора), не содержащих РНК вируса лихорадки долины Рифт, в том числе:

Образец	Положительные образцы*	Подтверждённые Положительные образцы	Отрицательные образцы*	Подтверждённые отрицательные образцы
Пробы, содержащие РНК вируса лихорадки долины Рифт	200	200	Образцы, содержащие РНК гетерологичных вирусов (вирус лихорадки Западного Нила (2 пробы), вирус желтой лихорадки (6 проб), вирус денге (4 пробы), вирус Зика (2 пробы), вирус чикунгунья (2 пробы), вирус венецуэльского энцефалита лошадей (4 пробы), вирус диареи крупного рогатого скота (2 пробы), вирус клещевого энцефалита (8 проб), вирус японского энцефалита (4 пробы), вирус уличного бешенства (2 пробы). Образцы, содержащие ДНК человека (136 проб), ДНК мыши (12 проб), ДНК <i>Escherichia coli</i> (8 проб), ДНК бактериофага (4 пробы), плазмидную ДНК (4 пробы)	200

*Согласно интерпретации результатов инструкции по применению «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

Диагностическая чувствительность - при исследовании 200 положительных проб (100 проб, содержащих вирус лихорадки долины Рифт, на 2-х сериях набора) положительный результат получен в 200 случаях. **Диагностическая чувствительность** – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %;

Диагностическая специфичность - при исследовании 200 отрицательных проб ДНК человека (68 проб), ДНК мыши (6 проб), ДНК *Escherichia coli* (4 пробы), ДНК бактериофага (2 пробы), плазмидную ДНК (2 пробы), и РНК гетерологичных вирусов (вирус лихорадки Западного Нила (1 проба), вирус желтой лихорадки (3 пробы), вирус денге (2 пробы), вирус Зика (1 проба), вирус чикунгунья (1 проба), вирус венецуэльского энцефалита лошадей (2 пробы), вирус диареи крупного рогатого скота (1 проба), вирус клещевого энцефалита (4 пробы), вирус японского энцефалита (2 пробы), вирус уличного бешенства (1 проба)) отрицательный результат получен в 200 случаях. **Диагностическая специфичность** – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %.

В КОЛИЧЕСТВЕ 86 ЛИСТОВ

« 17 11 2017 год

Ген. Директор
ООО «ВЭМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 16 листов

Шестнадцатый месяц

Зав. ОФТК ^(пропись) *ЛЗ* *Бирюсова М.П.*
Должность, подпись

ДОЛЖНОСТЬ, ПОДПИСЬ



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 17 листов

См. надпись листов
Эв. 067х пропись Г. Ефремова М.П.
должность, подпись

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Отдел разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний (отд. 02.16.00)

630559, рабочий поселок Кольцово
Новосибирской области
телефон ОБТК: 8(383)-336-73-16

П А С П О Р Т № 93 от 27.09.2017

Набор реагентов для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт методом ОТ-ПЦР с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«Вектор-ОТ-ПЦРв-ВЛДР»

Номер серии 010917
Количество в серии 12 наборов
Дата выпуска 27.09.2017

Контрольный номер ОБТК № 93
Дата изготовления 18.09.2017

Анализ выполнен по проекту TV 9398-056-05664012-2016

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
1. Внешний вид		
HS Taq полимераза – (P-1)	Опалесцирующая бесцветная жидкость	Опалесцирующая бесцветная жидкость
M-MuLV ревертаза – (P-2)	Опалесцирующая бесцветная жидкость	Опалесцирующая бесцветная жидкость
ВЛДР-смесь 1 – (P-3)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
ВЛДР-смесь 2 – (P-4)	Прозрачная жидкость розового цвета	Прозрачная жидкость розового цвета
ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО) – (P-5)*	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Отрицательный контрольный образец (ОКО) – (P-6)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Внутренний контрольный образец (ВКО) – (P-7)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Герметичность пробирок	При 1-2-х кратном переворачивании микропробирок не должно наблюдаться протечек веществ.	Соответствует
3. Функциональные (технические характеристики)		
3.1 Чувствительность	Набор реагентов должен выявлять в ПЦР от 10^2 и более копий рекомбинантной плазмиды, содержащей вставку ДНК, комплементарную участку РНК вируса лихорадки долины Рифт в 25 мкл реакционной смеси	Выявляет в ПЦР $1,0 \times 10^1$ копий. Использовали последовательные разведения СОП ВЛДР-К+ сер. 010917 (исходная концентрация - 10^7 копий/мл) с шагом

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
		10 от исходного до 10^{-5} . (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.)
3.2 Специфичность	Наличие положительного сигнала на канале FAM/Green в пробах с положительными контрольными образцами (СОП ВЛДР-К+ и ПКО) Отсутствие положительного сигнала на канале FAM/Green в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО и СОП ДНК человека).	Соответствует (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.) Наличие положительного сигнала на канале FAM в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО) и СОП ВЛДР-К+ серия 010917 Отсутствие флуоресцентного сигнала на канале FAM в ОКО и СОП ДНК человека серия № 01-10.16
3.3 Отсутствие ложноположительных/ложноотрицательных результатов		
3.3.1 Отрицательный контрольный образец	Значение Ct по каналу FAM/Green (канал кДНК ВЛДР) больше 32 или не определяется	Не определяется (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.)
3.3.2 Положительный контрольный образец	Значение Ct по каналу FAM/Green (канал кДНК ВЛДР) должно быть меньше или равно 32.	Менее 32 (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.)
3.4 Повторяемость	Коэффициент вариации для повторяемости не должен превышать 3 %	0,39
3.5 Воспроизводимость	Коэффициент вариации для воспроизводимости не должен превышать 6 %	0,62
4. Биологические препараты для производства и контроля	1. СОП ВЛДР-К+ – Стандартный образец предприятия – ВЛДР-положительный контроль ПЦР (рекомбинантная бактериальная плазмида, содержащая вирусспецифическую вставку (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Концентрация плазмидной ДНК составляет не менее 10^7 копий/мл. 2. СОП ДНК человека – концентрация не менее 10 нг/мл 3. ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО) – (Р-5). Инактивированная культуральная жидкость,	Концентрация 10^7 копий/мл (протокол № 1К_ВЛДР от 18 сентября 2017 г.) (протокол № 4С_ВЛДР_СОП от 18 сентября 2017 г.) 0,341 мкг/мл (протокол № 1 ДНК от 17 октября 2016 г.) Соответствует (протокол № 2С_ВЛДР_1 от 18 сентября 2017 г.)

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
	содержащая музейный штамм RVF 2002/09-ПС вируса лихорадки долины Рифт, в лизирующем растворе. 4. Отрицательный контрольный образец (ОКО) – (Р-6). Водный раствор ДНК фага λ, 0,005 мг/мл («СибЭнзим», кат. № D11). 5. Внутренний контрольный образец (ВКО) – (Р-7). Неспецифичный к ВЛДР ампликон или рекомбинантная бактериальная плазмида, содержащая неспецифичную к ВЛДР вставку. Подлинность контрольных образцов ПКО, ВКО и СОП ВЛДР-К+ подтверждается секвенированием.	Соответствует (протокол №1СП_ВЛДР_1 от 18 сентября 2017 г.) Соответствует (протокол №3С_ВЛДР_1 от 18 сентября 2017 г.)
Комплектность	В соответствии с требованиями проекта ТУ п. 1.3	Соответствует
Маркировка	В соответствии с требованиями проекта ТУ п. 1.5	Соответствует
Упаковка	В микропробирках вместимостью 0,5;1,5 мл с завинчивающейся крышкой (полипропиленовые, «SSI», США, артикул SSI-2140, SSI-2240 или аналогичные, разрешенные к применению в РФ). Набор реагентов упаковывают в пакет полиэтиленовый с застежкой («Медиген», Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или коробка из картона коробочного (ГОСТ 7933-89Е). В пакет или коробку вкладывают инструкцию по применению.	Соответствует

* При хранении раствора Р-5 при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С возможно образование растворимого кристаллического осадка.

Транспортирование набора реагентов должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с проектом ТУ 9398-056-05664012-2016 не более 3-х суток при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере.

Хранение при температуре минус 16 °С до минус 20 °С.

Следует избегать длительного размораживания реагентов.

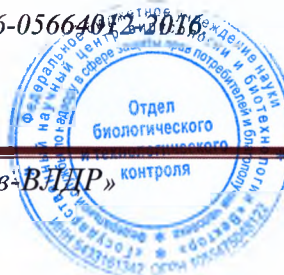
Срок годности – 1 год.

Заключение: соответствует проекту ТУ 9398-056-05664012-2016

Зав. ОБТК

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Паспорт на набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{рв}-ВЛДР»



М.П. Богрянцева

Страница 3 из 3

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Отдел разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний (отд. 02.16.00)

630559, рабочий поселок Кольцово
Новосибирской области
телефон ОБТК: 8(383)-336-73-16

П А С П О Р Т № 94 от 27.09.2017

Набор реагентов для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт методом ОТ-ПЦР с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«Вектор-ОТ-ПЦРв-ВЛДР»

Номер серии 020917
Количество в серии 12 наборов
Дата выпуска 27.09.2017

Контрольный номер ОБТК № 94
Дата изготовления 25.09.2017

Анализ выполнен по проекту ТУ 9398-056-05664012-2016

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
1. Внешний вид		
HS Taq полимераза – (P-1)	Опалесцирующая бесцветная жидкость	Опалесцирующая бесцветная жидкость
M-MuLV ревертаза – (P-2)	Опалесцирующая бесцветная жидкость	Опалесцирующая бесцветная жидкость
ВЛДР-смесь 1 – (P-3)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
ВЛДР-смесь 2 – (P-4)	Прозрачная жидкость розового цвета	Прозрачная жидкость розового цвета
ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО) – (P-5)*	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Отрицательный контрольный образец (ОКО) – (P-6)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Внутренний контрольный образец (ВКО) – (P-7)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Герметичность пробирок	При 1-2-х кратном переворачивании микропробирок не должно наблюдаться протечек веществ.	Соответствует
3. Функциональные (технические характеристики)		
3.1 Чувствительность	Набор реагентов должен выявлять в ПЦР от 10^2 и более копий рекомбинантной плазмиды, содержащей вставку ДНК, комплементарную участку РНК вируса лихорадки долины Рифт в 25 мкл реакционной смеси	Выявляет в ПЦР $1,0 \times 10^1$ копий. Использовали последовательные разведения СОП ВЛДР-К+ сер. 010917 (исходная концентрация - 10^7 копий/мл) с шагом 10 от исходного до 10^{-5} .

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
		(протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.)
3.2 Специфичность	Наличие положительного сигнала на канале FAM/Green в пробах с положительными контрольными образцами (СОП ВЛДР-К+ и ПКО) Отсутствие положительного сигнала на канале FAM/Green в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО и СОП ДНК человека).	Соответствует (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.) Наличие положительного сигнала на канале FAM в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО) и СОП ВЛДР-К+ серия 010917 Отсутствие флуоресцентного сигнала на канале FAM в ОКО и СОП ДНК человека серия № 01-10.16
3.3 Отсутствие ложноположительных/ ложноотрицательных результатов		
3.3.1 Отрицательный контрольный образец	Значение Ct по каналу FAM/Green (канал кДНК ВЛДР) больше 32 или не определяется	Не определяется (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.)
3.3.2 Положительный контрольный образец	Значение Ct по каналу FAM/Green (канал кДНК ВЛДР) должно быть меньше или равно 32.	Менее 32 (протокол № 1 от 27 сентября 2017 г.)
3.4 Повторяемость	Коэффициент вариации не должен превышать 3 %	0,92
3.5 Воспроизводимость	Коэффициент вариации не должен превышать 6 %	0,81
4. Биологические препараты для производства и контроля	1. СОП ВЛДР-К+ – Стандартный образец предприятия – ВЛДР-положительный контроль ПЦР (рекомбинантная бактериальная плаزمиды, содержащая вирусспецифическую вставку (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Концентрация плазмидной ДНК составляет не менее 10 ⁷ копий/мл. 2. СОП ДНК человека – концентрация не менее 10 нг/мл 3. ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО) – (Р-5). Инактивированная культуральная жидкость, содержащая музейный штамм RVF 2002/09-ПС вируса лихорадки долины Рифт, в	Концентрация 10 ⁷ копий/мл (протокол № 1К_ВЛДР от 18 сентября 2017 г.) (протокол № 4С_ВЛДР_СОП от 18 сентября 2017 г.) 0,341 мкг/мл (протокол № 1 ДНК от 17 октября 2016 г.) Соответствует (протокол № 2С_ВЛДР_2 от 25 сентября 2017 г.)

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
	лизирующем растворе. 4. Отрицательный контрольный образец (ОКО) – (Р-6). Водный раствор ДНК фага λ, 0,005 мг/мл («СибЭнзим», кат. № D11). 5. Внутренний контрольный образец (ВКО) – (Р-7). Неспецифичный к ВЛДР ампликон или рекомбинантная бактериальная плазмида, содержащая неспецифичную к ВЛДР вставку. Подлинность контрольных образцов ПКО, ВКО и СОП ВЛДР-К+ подтверждается секвенированием.	Соответствует (протокол №1СП_ВЛДР_2 от 25 сентября 2017 г.) Соответствует (протокол №3С_ВЛДР_2 от 25 сентября 2017 г.)
Комплектность	В соответствии с требованиями проекта ТУ п. 1.3	Соответствует
Маркировка	В соответствии с требованиями проекта ТУ п. 1.5	Соответствует
Упаковка	В микропробирках вместимостью 0,5; 1,5 мл с завинчивающейся крышкой (полипропиленовые, «SSI», США, артикул SSI-2140, SSI-2240 или аналогичные, разрешенные к применению в РФ). Набор реагентов упаковывают в пакет полиэтиленовый с застежкой («Медиген», Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или коробка из картона коробочного (ГОСТ 7933-89Е). В пакет или коробку вкладывают инструкцию по применению.	Соответствует

* При хранении раствора Р-5 при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С возможно образование растворимого кристаллического осадка.

Транспортирование набора реагентов должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с проектом ТУ 9398-056-05664012-2016 не более 3-х суток при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере.

Хранение при температуре минус 16°С до минус 20 °С.

Следует избегать длительного размораживания реагентов.

Срок годности – 1 год.

Заключение: соответствует проекту ТУ 9398-056-05664012-2016.

Зав. ОБТК

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



М.П. Богрянцева

ПРОТОКОЛ № 1 (от 27 сентября 2017 г.)
лабораторного испытания набора реагентов для выявления
РНК вируса лихорадки долины Рифт методом ОТ-ПЦР
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

серия 010917, дата изготовления 18.09.2017

серия 020917, дата изготовления 25.09.2017

1. Принцип метода.

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» предназначен для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene 6000 (“Corbett Life Science”, Австралия), CFX96 («Bio-Rad», США) или аналогичных приборах других производителей.

Метод основан на многократном увеличении числа копий фрагмента вирусных нуклеиновых кислот (комплементарной ДНК – кДНК) с одновременной гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации. Для проведения ПЦР в режиме реального времени используют специфические праймеры (прямой и обратный) и флуоресцентно-меченый зонд. Специфические праймеры обеспечивают амплификацию фрагментов кДНК, предварительно синтезированной в ходе реакции на матрице РНК, соответствующих нуклеотидной последовательности участка генома вируса лихорадки долины Рифт.

2. Меры предосторожности.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. ПЦР-анализ выполнялся в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

3. Анализируемые образцы.

В качестве анализируемых образцов использовали: отрицательный контрольный образец (ОКО), положительный контрольный образец (ПКО), представляющий собой инактивированную культуральную жидкость, содержащую музейный штамм RVF 2002/09-ПС вируса лихорадки долины Рифт в лизирующем растворе; СОП ДНК человека серия №01-10.16, представляющий собой ДНК человека выделенную из крови здоровых доноров. СОП ВЛДР-К+ серия №010917 представляющий собой рекомбинантную бактериальную плазмиду, содержащую вставку кДНК вируса лихорадки долины Рифт, штамм RVF 2002/09-ПС;

4. Экстракция РНК.

Экстракцию НК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) из 100 мкл. Процедуру проводили для положительного контрольного образца (ПКО, Р-5) и отрицательного контрольного образца (ОКО, Р-6) из состава набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР».

В пробирки вместимостью 1,5 мл вносили по 10 мкл Р-7 и 300 мкл раствора для лизиса, предварительно прогретого при 65°C до полного растворения кристаллов. В пробирку отрицательного контрольного образца вносили 100 мкл Р-6. В пробирку положительного контрольного образца вносили 10 мкл Р-5 и 90 мкл Р-6.

Содержимое пробирок тщательно перемешивали на вортексе, центрифугировали в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогревали в термостате при 65 °С 5 мин.

Добавляли по 400 мкл раствора для преципитации, перемешивали на вортексе, центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Удаляли супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавляли в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, осторожно промывали осадок, центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Удаляли супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавляли в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, осторожно промывали осадок, центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Удаляли супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Помещали пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания, при этом крышки пробирок оставляли открытыми.

В пробирки добавляли по 50 мкл РНК-буфера. Перемешивали на вортексе. Помещали в термостат на 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные НК.

5. Протокол ПЦР амплификации

Отбирали необходимое количество микропробирок. Готовили реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешивали в отдельной пробирке Р-3, Р-4, Р-1 и Р-2 из расчета на *каждую* реакцию:

- 10 мкл Р-3;
- 5 мкл Р-4;
- 0,2 мкл Р-1;
- 0,2 мкл Р-2.

В каждую микропробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером вносили по 15 мкл приготовленной реакционной смеси и 10 мкл анализируемой пробы.

ПЦР и детекцию результатов в режиме реального времени проводили на приборе CFX96 («Bio-Rad», США) используя следующую программу:

Температура, °С	Время	Каналы детекции флуоресценции	Количество циклов
45	30 мин	-	1
94	3 мин	-	1
94	10 с	-	5
55	30 с	-	
72	20 с	-	
94	10 с	-	35
55	30 с	FAM/Green, HEX/Yellow	
72	20 с	-	

Учет полученных результатов.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривых флуоресценции образцов с пороговыми линиями, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе таблицы результатов программы амплификатора. Пять первых нерегистрируемых циклов амплификации при анализе не учитывают. Для достоверной интерпретации результатов

следует учитывать значения «Ct», полученные для положительного, отрицательного и внутреннего контролей:

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		FAM/Green (канал кДНК ВЛДР)	HEX/Yellow (канал ВКО)
ПКО	Экстракция РНК и ОТ-ПЦР	< 25	< 25
ОКО	Экстракция РНК и ОТ-ПЦР	нет или > 32	< 25

■ Анализируемый образец считают **отрицательным**, т.е. не содержащим РНК ВЛДР, если значение «Ct» по каналу FAM (канал кДНК ВЛДР) больше **32** или не определяется. Исключениями являются случаи:

- если для образца, показавшего отрицательный результат, значение «Ct» для внутреннего контрольного образца (ВКО) по каналу HEX превышает **25** или не определяется, то результат анализа считается недостоверным, необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа экстракции;
- если значение «Ct» для положительного контрольного образца (ПКО) по каналу FAM превышает **25** или не определяется, то результаты анализа по всем образцам постановочной серии, показавшим отрицательный результат, считаются недостоверными, необходимо повторить анализ этих образцов, начиная с этапа экстракции.

■ Анализируемый образец считают **положительным**, т.е. содержащим РНК ВЛДР, когда кривая накопления флуоресценции имеет характерную экспоненциальную фазу роста и пересекает пороговую линию. При этом значение «Ct» по каналу FAM должно быть не больше **32**. Амплитуда сигнала не имеет значения. Исключением является случай, когда для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналу FAM значение «Ct» меньше или равно **32**. Это свидетельствует о наличии контаминации реагентов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем образцам постановочной серии, для которых был получен положительный результат, считаются недостоверными. Необходимо принять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ этих образцов, начиная с этапа экстракции.

6. Результаты

6.1 Контроль чувствительности

Контроль чувствительности осуществляли проведением ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, где в качестве исследуемых образцов использовали последовательные разведения СОП ВЛДР-К+ с шагом 10 от 10^7 до 10^2 копий плазмидной ДНК в мл. После учета и анализа результатов ПЦР определяли количество копий плазмидной ДНК в 25 мкл реакционной смеси последнего разведения, детектируемого как положительный образец.

Результат оценки специфичности и чувствительности представлен в таблице:

образец	Серия 010917		Серия 020917	
	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX
СОП ДНК человека	N/A	N/A	N/A	N/A
ОКО	N/A	23,12	N/A	22,50
ПКО	18,00	23,16	17,62	22,65

СОП ВЛДР-К+ ($1,0 \times 10^5$ копий в реакции)	17,29	N/A	17,19	N/A
СОП ВЛДР-К+ (-1) ($1,0 \times 10^4$ копий в реакции)	20,08	N/A	20,09	N/A
СОП ВЛДР-К+ (-2) ($1,0 \times 10^3$ копий в реакции)	23,16	N/A	22,98	N/A
СОП ВЛДР-К+ (-3) ($1,0 \times 10^2$ копий в реакции)	26,72	N/A	25,73	N/A
СОП ВЛДР-К+ (-4) ($1,0 \times 10^1$ копий в реакции)	28,31	N/A	30,22	N/A
СОП ВЛДР-К+ (-5) (1,0 копий в реакции)	32,47	N/A	N/A	N/A

Чувствительность набора реагентов:

Серия 010917..... $1,0 \times 10^1$

Серия 020917..... $1,0 \times 10^1$.

Чувствительность набора реагентов по ТУ должна составлять от 10^2 и более копий рекомбинантной плазмиды, несущей видоспецифическую вставку для вируса лихорадки долины Рифт, в 25 мкл реакционной смеси.

Наборы реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» серии 010917 и серии 020917 соответствует проекту ТУ 9398-056-05664012-2016 по специфичности и чувствительности.

6.2 Контроль повторяемости, воспроизводимости.

Контроль повторяемости и воспроизводимости осуществляли проведением ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, где в качестве положительных образцов использовали СОП ВЛДР-К+ разведенный до концентрации 1×10^5 копий/мл. Исследования проводили по 10 повторов двумя операторами в разные дни (всего 20 повторов).

Серия 010917

Повторяемость

День/оператор	№ обр	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл)		Стандартное отклонение	коэффициент вариации для повторяемости CV, %
		Ct FAM	Сред Ct FAM		
День 1 Оператор 1	1	24,50	24,43	0,09	0,39
	2	24,33			
	3	24,21			
	4	24,48			
	5	24,50			
	6	24,41			
	7	24,52			
	8	24,45			
	9	24,46			
	10	24,45			
День 2 Оператор 2	1	24,60	24,59	0,16	0,65
	2	24,88			
	3	24,57			

	4	24,55			
	5	24,80			
	6	24,58			
	7	24,54			
	8	24,63			
	9	24,47			
	10	24,30			

Воспроизводимость

Образцы	СОП ВЛДР-К+ (1x10 ⁵ копий/мл)
Всего повторов *	20
Среднее значение величины Ct	24,51
стандартное отклонение	0,15
коэффициент вариации CV, % (между тестами)	0,62

* общее число результатов, полученных в разные дни, разными операторами и т.д.

Серия 020917

Повторяемость

День/оператор	№ обр	СОП ВЛДР-К+ (1x10 ⁵ копий/мл)		Стандартное отклонение	коэффициент вариации для повторяемости CV, %
		Ct FAM	Сред Ct FAM		
День 1 Оператор 1	1	24,48	24,63	0,23	0,92
	2	24,44			
	3	24,58			
	4	24,24			
	5	24,88			
	6	24,5			
	7	24,93			
	8	24,71			
	9	24,9			
	10	24,6			
День 2 Оператор 2	1	24,19	24,42	0,08	0,34
	2	24,45			
	3	24,47			
	4	24,39			
	5	24,5			
	6	24,42			
	7	24,44			
	8	24,43			
	9	24,45			
	10	24,42			

Воспроизводимость

Образцы	СОП ВЛДР-К+ (1x10 ⁵ копий/мл)
Всего повторов*	20
Среднее значение величины St	24,52
стандартное отклонение	0,19
коэффициент вариации CV, % (между тестами)	0,81

* общее число результатов, полученных в разные дни, разными операторами и т.д.

Коэффициент вариации для повторяемости по ТУ не должен превышать 3 %.
Серии 010917 и 020917 соответствует проекту ТУ 9398-056-05664012-2016 по повторяемости.

Коэффициент вариации для воспроизводимости по ТУ не должен превышать 6 %.
Серии 010917 и 020917 соответствует проекту ТУ 9398-056-05664012-2016 по воспроизводимости.

Зав. лабораторией молекулярной
эпидемиологии особо опасных инфекций

В.А. Терновой

Н.с. отдела молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов

Е.В. Чуб

Зав. отделом биологического
и технологического контроля

М.П. Богрянцева



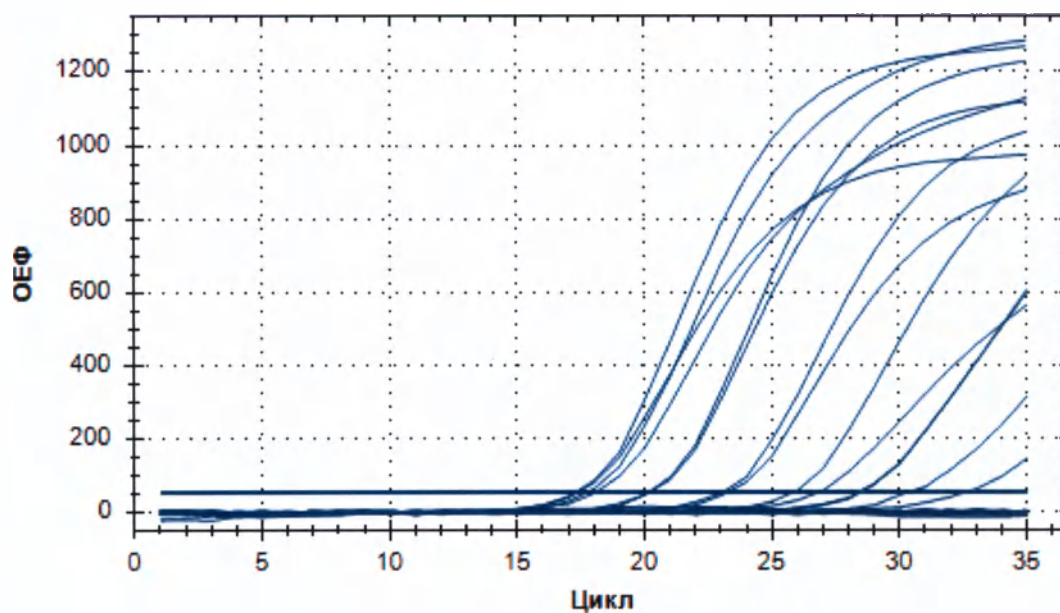
«Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

серия 010917, дата изготовления 18.09.2017

серия 020917, дата изготовления 25.09.2017

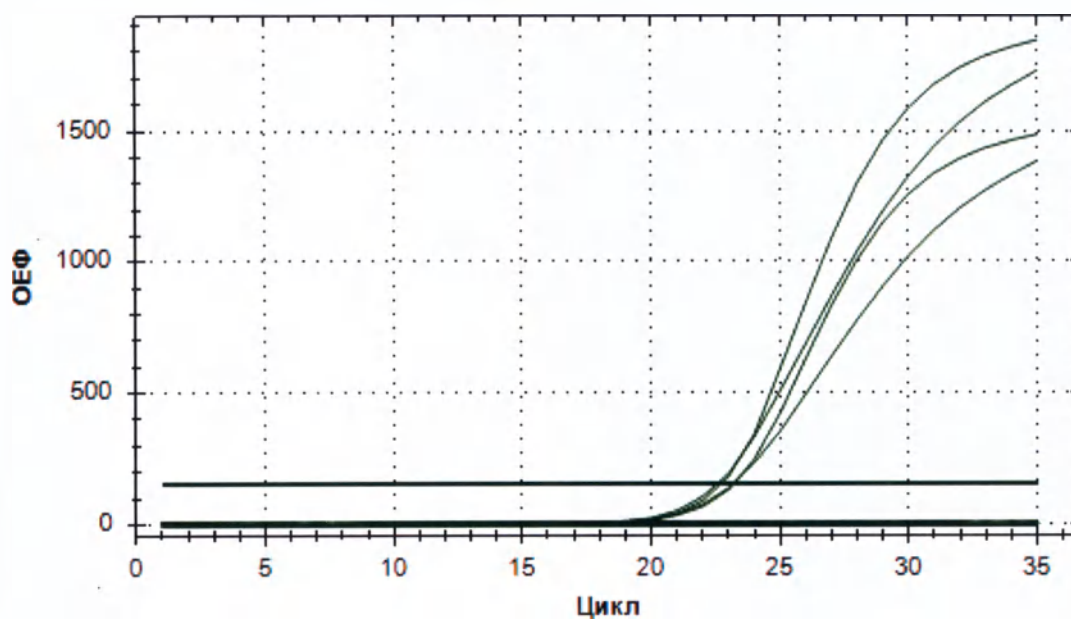
Канал FАМ

Амплификация



Канал HEX

Амплификация



№	Поз	Тип	Описание	Ct FAM	Ct HEX
1	A01	ИО	СОП ДНК человека	N/A	N/A
2	B01	ИО	ОКО	N/A	23,12
3	C01	ИО	ПКО	18,00	23,16
4	D01	ИО	СОП ВЛДР-К+ ($1,0 \times 10^5$ копий в реакции)	17,29	N/A
5	E01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-1) ($1,0 \times 10^4$ копий в реакции)	20,08	N/A
6	F01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-2) ($1,0 \times 10^3$ копий в реакции)	23,16	N/A
7	G01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-3) ($1,0 \times 10^2$ копий в реакции)	26,72	N/A
8	H01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-4) ($1,0 \times 10^1$ копий в реакции)	28,31	N/A
9	A02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-5) (1,0 копий в реакции)	32,47	N/A
10	B02	ИО	СОП ДНК человека	N/A	N/A
11	C02	ИО	ОКО	N/A	22,50
12	D02	ИО	ПКО	17,62	22,65
13	E02	ИО	СОП ВЛДР-К+ ($1,0 \times 10^5$ копий в реакции)	17,19	N/A
14	F02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-1) ($1,0 \times 10^4$ копий в реакции)	20,09	N/A
15	G02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-2) ($1,0 \times 10^3$ копий в реакции)	22,98	N/A
16	H02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-3) ($1,0 \times 10^2$ копий в реакции)	25,73	N/A
17	A03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-4) ($1,0 \times 10^1$ копий в реакции)	30,22	N/A
18	B03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (-5) (1,0 копий в реакции)	N/A	N/A

«Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

серия 010917, дата изготовления 18.09.2017

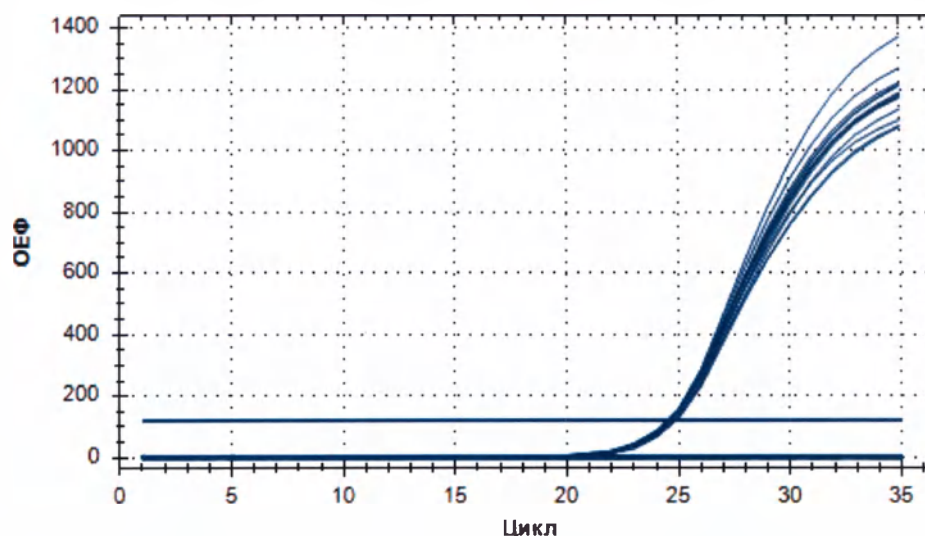
серия 020917, дата изготовления 25.09.2017

День 1

Оператор 1

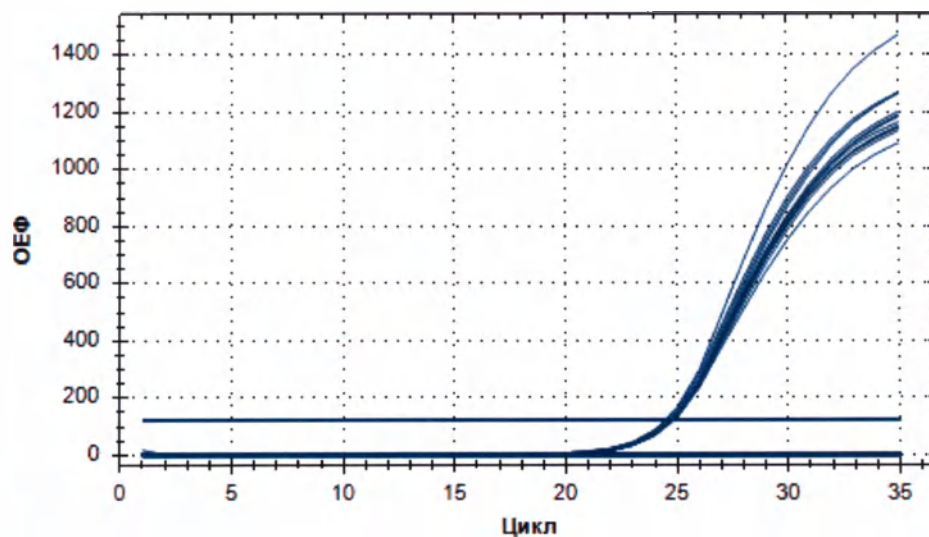
Канал HEX

Амплификация



№	Поз	Тип	Описание	Ct FAM
1	A01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,50
2	B01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,33
3	C01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,21
4	D01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,48
5	E01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,50
6	F01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,41
7	G01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,52
8	H01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,45
9	A02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,46
10	B02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,45
11	C02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,48
12	D02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,44
13	E02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,58
14	F02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,24
15	G02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,88
16	H02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,50
17	A03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,93
18	B03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,71
19	C03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,90
20	D02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,60

День 2
Оператор2
Канал HEX
Амплификация



№	Поз	Тип	Описание	Ct FAM
1	A01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,60
2	B01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,88
3	C01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,57
4	D01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,55
5	E01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,80
6	F01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,58
7	G01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,54
8	H01	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,63
9	A02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,47
10	B02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 010917	24,30
11	C02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,19
12	D02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,45
13	E02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,47
14	F02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,39
15	G02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,50
16	H02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,42
17	A03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,44
18	B03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,43
19	C03	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,45
20	D02	ИО	СОП ВЛДР-К+ (1×10^5 копий/мл) серия 020917	24,42

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Отдел разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний (02.16.00)

630559, рабочий поселок Кольцово
Новосибирской области
телефон ОБТК: 8(383)-336-73-16

П А С П О Р Т № 92 от 25.09.2017

Стандартный образец предприятия

ВЛДР- положительный контроль ПЦР для определения аналитической чувствительности
набора реагентов для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт

СОП «ВЛДР-К⁺»

Номер серии № 010917

Количество в серии 6 микропробирок

Дата выпуска 25.09.2017

Контрольный номер ОБТК № 92

Дата изготовления 07.09.2017

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
Внешний вид	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
Подлинность, специфичность	Содержит специфичную нуклеотидную последовательность 5'-AGGAGCATCTGAAATAGGTTCAACTTTAC TACCCTCCATGTCGATAGATGTGGAAGATAT GGCCAATTTTGTTCACGATTTCACCTTTGGCC ACTTAGCTGACAAGACTGACAGACTGTTAAT GCGTGAGTTTCCCATGATGAATGACGGGTTT GATCATTTGAGCC-3'	Соответствует (протокол № 4С_ВЛДР_СОП от 18 сентября 2017 г.)
Объем	0,2 мл	Соответствует
Концентрация	Концентрация плазмидной ДНК – не менее 10 ⁷ копий/мл	10 ⁷ копий/мл (протокол № 1К_ВЛДР от 18 сентября 2017 г.)
Упаковка	Микропробирка с основанием вместимостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой («SSI», США, артикул SSI-2240 или аналогичные).	Соответствует
Маркировка	Этикетка из прозрачной пленки на клейкой основе («Lomond» или аналогичной) с указанием сокращенного наименования предприятия-изготовителя, краткого названия набора реагентов, названия компонента и его объема; номера серии, даты изготовления, срока годности (годен до) и условий хранения, надписи «Только для in vitro диагностики»	Соответствует

Хранение при температуре минус 16°С до минус 20°С.

Срок годности – 1 год.

Заключение:

Соответствует требованиям проекта лабораторного регламента № ЛР 05664012-032-16 и проекта ТУ 9398-056-05664012-2016.

Зав. ОБТК

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



М.П. Богрянцева

ПРОТОКОЛ № 4С_ВЛДР_СОП (от 18 сентября 2017 г.)

секвенирования фрагмента ДНК, амплифицированного со стандартного образца предприятия – ВЛДР-положительного контроля ПЦР (СОП ВЛДР-К+) для определения аналитической чувствительности набора реагентов для выявления РНК вируса лихорадки долины Рифт

серия 010917, дата изготовления 07.09.2017 г.

СОП ВЛДР-К+ представляет собой рекомбинантную бактериальную плазмиду, содержащую вставку кДНК вируса лихорадки долины Рифт. Секвенирование ВЛДР-специфичного фрагмента выполнено с использованием набора реагентов «BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing PR100» («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 8 мкл раствора «Terminator Ready Reaction Mix», 3,2 пкМ каждого праймера (RVFV-2s 5'-AGGAGCATCTGAAATAGG-3' и RVFV-2a 5'-GGCTCAAATGATCAAMCC-3') и 0,3 мкг анализируемой плазмидной ДНК.

Полимеразную реакцию с терминирующими агентами проводили в амплификаторе «MJ Mini™» («Bio-Rad», США) с использованием следующей программы температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Количество циклов
96	1 мин	1
96	10 сек	25
50	5 сек	
60	4 мин	
4	хранение	1

Секвенирование по обеим цепям ДНК проводили на автоматическом анализаторе «xL3500» («Applied Biosystems», США). Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм), их состыковку и проверку осуществляли с помощью программы «Sequencer 4.0.5.» («Gene Codes Corporation», США).

В результате секвенирования получена нуклеотидная последовательность:

5'-AGGAGCATCTGAAATAGGTTCAACTTTACTACCCTCCATGTTCGATAGATGTGGAA
GATATGGCCAATTTTGTTCACGATTTTACCTTTGGCCACTTAGCTGACAAGACTGAC
AGACTGTTAATGCGTGAGTTTCCCATGATGAATGACGGGTTTGATCATTTGAGCC-3',

соответствующая фрагменту кДНК гена РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса лихорадки долины Рифт, штамм RVF 2002/09-ПС (GenBank № HM586953.1, позиции 180-346).

Н.с. отдела разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Man

Б.С. Малышев

Зав. отделом разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Ж

Н.А. Нетесова

ПРОТОКОЛ № 1К_ВЛДР (от 18 сентября 2017 г.)
определение концентрации плазмидной ДНК в препарате, использованном для
приготовления
СОП ВЛДР-К+ серии 010917

СОП ВЛДР-К+ представляет собой раствор рекомбинантной бактериальной плазмиды, содержащей вставку кДНК вируса лихорадки долины Рифт, с концентрацией плазмидной ДНК не менее 10^7 копий/мл.

Препарат плазмидной ДНК, использованной для приготовления СОП ВЛДР-К+, получен из компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* штамм JM109, трансформированных рекомбинантной бактериальной плазмидой, несущей вирусспецифичную вставку.

Концентрация (С) выделенной плазмидной ДНК, определенная с помощью спектрофотометра NanoView PlusTM («GE Healthcare», США), составила 402,5 мкг/мл (среднее значение трех повторных измерений).

Пересчет концентрации ДНК [мкг/мл] в количество копий (соответствующее числу копий кДНК вируса лихорадки долины Рифт) произведен с учетом молекулярного веса рекомбинантной плазмиды по формуле (1):

$$M = \frac{C \cdot 10^{-6} \cdot 6,02 \cdot 10^{23}}{2853 \cdot 2 \cdot 3,26 \cdot 10^2} \quad (1)$$

где M – количество копий плазмидной ДНК [копий/мл];

C – концентрация рекомбинантной плазмиды [мкг/мл];

10^{-6} – коэффициент перевода [мкг/мл] в [г/мл];

$6,02 \cdot 10^{23}$ – число Авогадро;

2853 – размер плазмиды [пар оснований, п.н.];

$3,26 \cdot 10^2$ – средний молекулярный вес одного звена нуклеотидной цепи [Да].

Концентрация плазмидной ДНК в данном препарате составила $13,02 \times 10^{13}$ копий/мл.

Для получения СОП ВЛДР-К+ с концентрацией 10^7 копий/мл выполнено последовательное разведение исходного препарата рекомбинантной плазмиды РНК-буфером из набора «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио»).

С.н.с. отдела разработки средств ПЦР-диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний

Н.А. Сметанникова

Зав. отделом разработки средств ПЦР-диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний

Н.А. Нетесова

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Отдел «Коллекция микроорганизмов»

630559, рабочий поселок Кольцово
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-336-73-16

П А С П О Р Т № 84 от 17.10.2016

Стандартный образец предприятия – ДНК человека
(СОП ДНК человека)

Номер серии № 01-10.16
Количество в серии 5
Дата выпуска 17.10.2016

Контрольный номер ОБТК № 84
Дата изготовления 10.10.2016

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Внешний вид	СОП ДНК человека – прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Подлинность, специфичность	Исследуемый образец СОП ДНК человека должен определяться, как отрицательный	Соответствует
Объем	0,5 мл	Соответствует
Концентрация	Концентрация ДНК – не менее 10 нг/мл	0,341 мкг/мл
Упаковка	В микропробирке объемом 1,0 мл (полипропиленовые, "Ахуген", США Кат. № МСТ-060 или аналогичные). СОП ДНК человека упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой ("Медиген", Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку.	Соответствует
Маркировка	На микропробирки наклеивают этикетки из бумаги писчей на клеящей основе (с указанием: сокращенного названия предприятия-изготовителя, (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) сокращенного названия стандартного образца предприятия, объема, номера серии, даты изготовления, срока годности (годен до), условий хранения.	Соответствует
Назначение		Для специфичности наборов реагентов

Хранение при температуре минус 20 °С.

Срок годности – 1 год.

Заключение: соответствует лабораторному регламенту № ЛР 05664012-010-12.

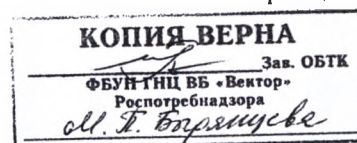
Зав. ОБТК

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



[Handwritten signature]

М.П.Богрянцева



ПРОТОКОЛ № 1 ДНК (от 17.10.2016 г.)
контроля «Стандартного образца предприятия – ДНК человека»
(СОП ДНК человека)

серия №01-10.16, дата изготовления 10.10.2016 г.

1. Характеристика реагента

«СОП ДНК человека» – водный раствор ДНК, выделенной из крови здоровых доноров, используется в качестве контрольного образца для контроля специфичности наборов реагентов.

2. Контроль концентрации ДНК

Концентрацию ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США).

Концентрация СОП ДНК человека, серии №01-10.16 - 0,341 мкг/мл.

Н.с. отдела молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов

Е.В. Чуб

Зав. отделом биологического
и технологического контроля
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

М.П. Богрянцева



ПРОТОКОЛ № 1СП_ВЛДР_1 (от 18 сентября 2017 г.)

оценки специфичности набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» в отношении отрицательного контрольного образца экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ОКО) – Р-6

Серия 010917, дата изготовления 18.09.2017

Отрицательный контрольный образец экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ОКО) – Р-6 из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» представляет собой водный раствор ДНК фага λ (концентрация 5 мкг/мл) Назначение ОКО (Р-6) – контроль возможной контаминации реагентов, используемых для экстракции РНК и проведения ОТ-ПЦР.

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» включает систему для детекции генетического материала вируса лихорадки долины Рифт, состоящую из пары праймеров и флуоресцентно-меченного зонда:

Прямой праймер RVFV-2s: 5'-AGGAGCATCTGAAATAGG-3'

Обратный праймер RVFV-2a: 5'-GGCTCAAATGATCAAMCC-3'

Зонд RVFV-2: 5'-FAM-TCATCATGGGAAACTCACGCA-BHQ1-3'.

Кроме того, набор содержит праймеры и зонд, предназначенные для детекции внутреннего контрольного образца (ВКО, Р-7):

Прямой праймер IC_N200_S56: 5'-GGTAGTTCAGTTGAGTTG-3';

Обратный праймер IC_N200_A56: 5'-GTCTCTGTCATTAACCTC-3';

Зонд IC_N200_TM56: 5'-HEX-TCTCGTGACCTTGTGCTAT-BHQ2-3'.

Отсутствие в составе ОКО (Р-6) последовательностей нуклеиновых кислот, выявляемых набором реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР», подтверждали результатами контрольной ОТ-ПЦР с внесением ОКО (Р-6) в качестве экспериментальной пробы.

Контрольную ОТ-ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава:

ВКЭ-смесь 1 (Р-3) 10 мкл

ВКЭ-смесь 2 (Р-4) 5 мкл

HS Таq полимераза (Р-1) 0,2 мкл

М-MuLV ревертаза (Р-2) 0,2 мкл

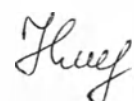
Исследуемый ОКО 10 мкл

ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени» проводили в амплификаторе «CFX96» («Bio-Rad», США) согласно следующей программе температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Каналы детекции флуоресценции	Количество циклов
45	30 мин	-	1
94	3 мин	-	1
94	10 с	-	5
55	30 с	-	
72	20 с	-	
94	10 с	-	35
55	30 с	FAM/Green, HEX/Yellow	
72	20 с	-	

Отсутствие роста флуоресцентного сигнала по каналам детекции FAM/Green и HEX/Yellow подтверждает, что ОКО (Р-6) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР», серия 010917, не содержит последовательностей нуклеиновых кислот, выявляемых данным набором.

Н.С. отдела разработки средств ПЦР-диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний

 Н.А. Сметанникова

Н.С. отдела разработки средств ПЦР-диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний

 Н.А. Нетесова

ПРОТОКОЛ № 2С_ВЛДР_1 (от 18 сентября 2017 г.)
секвенирования фрагмента ДНК, амплифицированного с ВЛДР-положительного
контрольного образца (ПКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

серия 010917, дата изготовления 18.09.2017 г.

ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» представляет собой инактивированную культуральную жидкость, содержащую музейный штамм RVF 2002/09-ПС вируса лихорадки долины Рифт, в лизирующем растворе. Фрагмент ДНК для секвенирования получен путем обратной транскрипции вирусной РНК, выделенной из материала ПКО, с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции.

Секвенирование целевого фрагмента ДНК выполнено с использованием набора реагентов «BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing PR100» («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 8 мкл раствора «Terminator Ready Reaction Mix», 3,2 пкМ каждого праймера (RVFV-2s 5'-AGGAGCATCTGAAATAGG-3' и RVFV-2a 5'-GGCTCAAATGATCAAMCC-3') и 0,3 мкг анализируемой кДНК.

Полимеразную реакцию с терминирующими агентами проводили в амплификаторе «MJ Mini™» («Bio-Rad», США) с использованием следующей программы температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Количество циклов
96	1 мин	1
96	10 сек	25
50	5 сек	
60	4 мин	
4	хранение	1

Секвенирование по обеим цепям ДНК проводили на автоматическом анализаторе «xL3500» («Applied Biosystems», США). Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм), их состыковку и проверку осуществляли с помощью программы «Sequencer 4.0.5.» («Gene Codes Corporation», США).

В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность:

5'-ATCACAGTGCTGGACATGCACCCAGGCTCTGGGAAGACCCACAGAG
TCCTCCCGGAGCTCATTCGTCAATGCATTGACAGACGCCTAAG-3',

соответствующая фрагменту кДНК гена РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса лихорадки долины Рифт, штамм RVF 2002/09-ПС (GenBank № HM586953.1, позиции 180-346).

Н.с. отдела разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Б.С. Малышев

Зав. отделом разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Н.А. Нетесова

ПРОТОКОЛ № 3С_ВЛДР_1 (от 18 сентября 2017 г.)
секвенирования фрагмента ДНК, амплифицированного с внутреннего контрольного образца
(ВКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

серия 010917, дата изготовления 18.09.2017 г.

Внутренний контрольный образец (ВКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» представляет собой ампликон, полученный с кДНК вируса кори, штамм Ленинград 16. Секвенирование ВКО выполнено с использованием набора реагентов «BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing PR100» («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 8 мкл раствора «Terminator Ready Reaction Mix», 3,2 пкМ каждого праймера (IC_N200_S56 5'-GGTAGTTCA GTTGAGTTG-3' и IC_N200_A56 5'-GTCTCTGTCATTAACCTC-3') и 0,3 мкг анализируемого фрагмента ДНК.

Полимеразную реакцию с терминирующими агентами проводили в амплификаторе «MJ MiniTM» («Bio-Rad», США) с использованием следующей программы температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Количество циклов
96	1 мин	1
96	10 сек	25
50	5 сек	
60	4 мин	
4	хранение	1

Секвенирование по обеим цепям ДНК проводили на автоматическом анализаторе «xL3500» («Applied Biosystems», США). Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм), их состыковку и проверку осуществляли с помощью программы «Sequencer 4.0.5.» («Gene Codes Corporation», США).

В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность:

5'-GGTAGTTTCAGTTGAGTTGCTAATCTCTCGTGACCTTGTTGCTATAATCAGTAAA
GAGTCTCAACATGTATATTACCTGACATTTGAACTGGTTTTGATGTATTGTGATGTCATA
GAGGGGAGGTTAATGACAGAGAC-3',

соответствующая фрагменту кДНК гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (L) вируса кори, штамм Ленинград 16 (GenBank № JF727650.1, позиции 9825-9961).

В.н.с. отдела разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Мал

Б.С. Малышев

Зав. отделом разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Н

Н.А. Нетесова

ПРОТОКОЛ № 1СП_ВЛДР_2 (от 25 сентября 2017 г.)

оценки специфичности набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» в отношении отрицательного
контрольного образца экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ОКО) – Р-6

Серия 020917, дата изготовления 25.09.2017

Отрицательный контрольный образец экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ОКО) – Р-6 из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» представляет собой водный раствор ДНК фага λ (концентрация мкг/мл). Назначение ОКО (Р-6) – контроль возможной контаминации реагентов, используемых для экстракции РНК и проведения ОТ-ПЦР.

Набор реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» включает систему для детекции генетического материала вируса лихорадки долины Рифт, состоящую из пары праймеров и флуоресцентно-меченного зонда:

Прямой праймер RVFV-2s: 5'-AGGAGCATCTGAAATAGG-3'

Обратный праймер RVFV-2a: 5'-GGCTCAAATGATCAAMCC-3'

Зонд RVFV-2: 5'-FAM-TCATCATGGGAAACTCACGCA-BHQ1-3'.

Кроме того, набор содержит праймеры и зонд, предназначенные для детекции внутреннего контрольного образца (ВКО, Р-7):

Прямой праймер IC_N200_S56: 5'-GGTAGTTCAGTTGAGTTG-3';

Обратный праймер IC_N200_A56: 5'-GTCTCTGTCATTAACCTC-3';

Зонд IC_N200_TM56: 5'-HEX-TCTCGTGACCTTGTTGCTAT-BHQ2-3'.

Отсутствие в составе ОКО (Р-6) последовательностей нуклеиновых кислот, выявляемых набором реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР», подтверждали результатами контрольной ОТ-ПЦР с внесением ОКО (Р-6) в качестве экспериментальной пробы.

Контрольную ОТ-ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава:

ВКЭ-смесь 1 (Р-3)	10 мкл
ВКЭ-смесь 2 (Р-4)	5 мкл
HS Taq полимераза (Р-1)	0,2 мкл
М-MuLV ревертаза (Р-2)	0,2 мкл
Исследуемый ОКО	10 мкл

ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени» проводили в амплификаторе «CFX96» («Bio-Rad», США) согласно следующей программе температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Каналы детекции флуоресценции	Количество циклов
45	30 мин	-	1
94	3 мин	-	1
94	10 с	-	5
55	30 с	-	
72	20 с	-	
94	10 с	-	35
55	30 с	FAM/Green, HEX/Yellow	
72	20 с	-	

Отсутствие роста флуоресцентного сигнала по каналам детекции FAM/Green и HEX/Yellow подтверждает, что ОКО (Р-6) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР», серия 020917, не содержит последовательностей нуклеиновых кислот, выявляемых данным набором.

С.н.с. отдела разработки средств ПЦР-диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний

Н.А. Сметанникова

Зав. отделом разработки средств ПЦР-диагностики
вирусных и риккетсиозных заболеваний

Н.А. Нетесова

ПРОТОКОЛ № 2С_ВЛДР_2 (от 25 сентября 2017 г.)
секвенирования фрагмента ДНК, амплифицированного с ВЛДР-положительного
контрольного образца (ПКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»

серия 020917, дата изготовления 25.09.2017 г.

ВЛДР-положительный контрольный образец (ПКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» представляет собой инактивированную культуральную жидкость, содержащую музейный штамм RVF 2002/09-ПС вируса лихорадки долины Рифт, в лизирующем растворе. Фрагмент ДНК для секвенирования получен путем обратной транскрипции вирусной РНК, выделенной из материала ПКО, с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции.

Секвенирование целевого фрагмента ДНК выполнено с использованием набора реагентов «BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing PR100» («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 8 мкл раствора «Terminator Ready Reaction Mix», 3,2 пкМ каждого праймера (RVFV-2s 5'-AGGAGCATCTGAAATAGG-3' и RVFV-2a 5'-GGCTCAAATGATCAAMCC-3') и 0,3 мкг анализируемой кДНК.

Полимеразную реакцию с терминирующими агентами проводили в амплификаторе «MJ MiniTM» («Bio-Rad», США) с использованием следующей программы температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Количество циклов
96	1 мин	1
96	10 сек	25
50	5 сек	
60	4 мин	
4	хранение	1

Секвенирование по обеим цепям ДНК проводили на автоматическом анализаторе «xL3500» («Applied Biosystems», США). Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм), их состыковку и проверку осуществляли с помощью программы «Sequencer 4.0.5.» («Gene Codes Corporation», США).

В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность:

5'-ATCACAGTGCTGGACATGCACCCAGGCTCTGGGAAGACCCACAGAG
TCCTCCCGGAGCTCATTCGTCAATGCATTGACAGACGCCTAAG-3',

соответствующая фрагменту кДНК гена РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса лихорадки долины Рифт, штамм RVF 2002/09-ПС (GenBank № HM586953.1, позиции 180-346).

В.н.с. отдела разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Man

Б.С. Малышев

Зав. отделом разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

He

Н.А. Нетесова

ПРОТОКОЛ № 3С_ВЛДР_2 (от 25 сентября 2017 г.)
секвенирования фрагмента ДНК, амплифицированного с внутреннего контрольного образца
(ВКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР»
серия 020917, дата изготовления 25.09.2017 г.

Внутренний контрольный образец (ВКО) из набора реагентов «Вектор-ОТ-ПЦР_{РВ}-ВЛДР» представляет собой ампликон, полученный с кДНК вируса кори, штамм Ленинград 16. Секвенирование ВКО выполнено с использованием набора реагентов «BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing PR100» («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 8 мкл раствора «Terminator Ready Reaction Mix», 3,2 пкМ каждого праймера (IC_N200_S56 5'-GGTAGTTCA GTTGAGTTG-3' и IC_N200_A56 5'-GTCTCTGTCAATTAACCTC-3') и 0,3 мкг анализируемого фрагмента ДНК.

Полимеразную реакцию с терминирующими агентами проводили в амплификаторе «MJ MiniTM» («Bio-Rad», США) с использованием следующей программы температурно-временных циклов:

Температура, °C	Время	Количество циклов
96	1 мин	1
96	10 сек	25
50	5 сек	
60	4 мин	
4	хранение	1

Секвенирование по обеим цепям ДНК проводили на автоматическом анализаторе «xL3500» («Applied Biosystems», США). Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм), их состыковку и проверку осуществляли с помощью программы «Sequencer 4.0.5.» («Gene Codes Corporation», США).

В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность:

5'-GGTAGTTCAGTTGAGTTGCTAATCTCTCGTGACCTTGTTGCTATAATCAGTAAA
GAGTCTCAACATGTATATTACCTGACATTTGAACTGGTTTTGATGTATTGTGATGTCATA
GAGGGGAGGTTAATGACAGAGAC-3',

соответствующая фрагменту кДНК гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (L) вируса кори, штамм Ленинград 16 (GenBank № JF727650.1, позиции 9825-9961).

В.н.с. отдела разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

Man

Б.С. Малышев

Зав. отделом разработки средств
ПЦР-диагностики вирусных и
риккетсиозных заболеваний

JK

Н.А. Нетесова



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 27 листов

Двадцать семь листов
прописью
Зав. ОВХ М.П. Вязицкая М.П.
должность, подпись

КОПИЯ

г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, к. 352
Тел/факс: (495) 977-7455 Тел.: (495) 984-69-93
e-mail: syntol@iab.ac.ru www.syntol.ru

ЗАО «СИНТОЛ»

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА
«ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ»
«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ РНК ВИРУСОВ
ЛИХОРАДОК ЗАПАДНОГО НИЛА И ДОЛИНЫ РИФТ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ОМ-СКРИН-ЛЗН/ЛДР-РВ)
ПО ТУ 9398-001-46395995-2013»

Серия 240817Наборов в серии 10 шт.Дата изготовления 24.08.17

Пункт ТУ	Наименование показателя	Требования 9398-001-46395995-2013	Результаты контроля
1.3	Комплектность	Комплект включает 6 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, две пробирки объемом 1,5 мл, четыре пробирки объемом 0,5 мл	Соответствует
1.5	Упаковка и маркировка	Пакеты типа Zip-lock, этикетки из бумаги	Соответствует
1.2, табл. 1, п. 1, 2	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ЛЗН/ЛДР*	Сухое вещество белого цвета	Соответствует
	Разбавитель, РБ**	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,8	Соответствует
	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	Сухое вещество белого цвета	Соответствует
	Положительный контрольный образец, ПКО-ЛЗН/ЛДР	Сухое вещество белого цвета	Соответствует
	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,0	Соответствует
1.2, табл. 1, п. 3	Положительный результат ПЦР-РВ.	Регистрация сигнала в пробирках с ПКО-ЛЗН/ЛДР по каналам FAM, R6G, ROX и Cy5	Соответствует
	Отрицательный результат ПЦР-РВ	Регистрация сигнала в пробирках с ОКО по каналам FAM и Cy5; Отсутствие регистрации сигнала в пробирках с ОКО по каналам R6G и ROX	Соответствует
	Аналитическая чувствительность	Регистрация сигнала в пробирках с: СКО-ЛЗН по каналам FAM, ROX и Cy5 СКО-ЛДР по каналам FAM, R6G и Cy5	Соответствует

Примечания:

*Содержит дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, специфические праймеры, флуоресцентные зонды, Taq-полимеразу, MMV-ревертазу, РНК внутреннего положительного контроля, трегалозу для проведения ОТ-ПЦР-РВ.

**Содержит ПЦР буфер (KCl, TrisHCl (pH 8,8), MgCl₂, глицерол).

Заключение ОБТК: «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ) по ТУ 9398-001-46395995-2013» серии 240817 по своим показателям соответствует требованиям технических условий.

Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

Транспортировать крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до 20 °С.

Годен до: 09.2018.
Начальник отдела ОБТК

Н.А. Парыгина

Паспорт № 6/2017
24 » 08 2017 г.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 24 ноября 2015 года № РЗН 2015/3358

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ) по ТУ 939816-001-46395995-2013

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Закрытое акционерное общество "Синтол" (ЗАО "Синтол"), Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

Производитель

Закрытое акционерное общество "Синтол" (ЗАО "Синтол"), Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

Место производства медицинского изделия

127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

Номер регистрационного досье № РД-3314/5751 от 07.03.2014

Вид медицинского изделия -

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции для медицинского изделия 93 9816

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 24 ноября 2015 года № 8652
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0014878

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 24 ноября 2015 года № РЗН 2015/3358

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ) по ТУ 939816-001-46395995-2013, в составе:

1. Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ЛЗН/ЛДР - 6 стрипов;
2. Разбавитель, РБ - 1 пробирка;
3. Положительный контрольный образец, ПКО-ЛЗН/ЛДР - 3 пробирки;
4. Раствор для разбавления ПКО, ОКО - 1 пробирка;
5. Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК - 1 пробирка.

Комплектность:

1. Набор реагентов "ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ.
2. Инструкция по применению.
3. Паспорт набора.

Handwritten mark resembling the letter 'Z'.

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0015385



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 3 листов

При печати
подпись
М.П. Буряков
должность, подпись

**Инструкция по применению набора сравнения -
«Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного
Нила и долины Рифт методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-
Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ) по ТУ 939816-001-46395995-2013»**

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 24.11.2015 № 8652

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ОЖО «Интелли»

А. В. Кутубов

2015г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации РНК
вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт методом полимеразной
цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ)
по ТУ 9398-001-46395995-2013»

2014

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

«Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ) по ТУ 9398-001-46395995-2013».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) РНК вирусов лихорадок Западного Нила (ЛЗН) и долины Рифт (ЛДР) в препаратах НК, выделенных из проб объектов окружающей среды, воздуха, насекомых, проб клинических образцов, вирусосодержащей суспензии, биопсийного и аутопсийного материала.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфических патологий (лихорадок Западного Нила и долины Рифт) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА), в объектах окружающей среды; как ускоренного предварительного теста при выполнении культурального и биологического методов исследования и идентификации подозрительных культур, для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора - клиническая лабораторная диагностика лихорадок Западного Нила и долины Рифт, специфическая индикация патогенных биологических агентов, эпидемиологический мониторинг, научные исследования. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, вирусологических лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Росздравнадзора, в эпидемиологических службах для расшифровки вспышек арбовирусных инфекций, а также в стационарных и мобильных лабораториях специализированных учреждений других министерств и ведомств, в том числе Министерства Обороны.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 5 реагентов.

№	Состав набора	Описание	Объем	Кол-во
1	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ЛЗН/ЛДР	сухое вещество белого цвета	1 мг	6 стрипов
2	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3	Положительный контрольный образец, ПКО-ЛЗН/ЛДР	сухое вещество белого цвета	2 мг	3 пробирки
4	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
5	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	сухое вещество белого цвета	2 мг	1 пробирка

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ЛЗН/ЛДР, расфасована в микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, упакованные в непрозрачный полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 9×12 см, состав: эквимольная смесь дideoксинуклеозидтрифосфатов, десять олигонуклеотидных праймеров, четыре флуоресцентных зонда, фермент Taq ДНК-полимераза, фермент MMLV-ревертаза; синтетическая РНК внутреннего положительного контроля, ВПК, трегалоза.

Разбавитель, РБ, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с закрывающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ПЦР-буфер; хлорид магния; глицерол; вода для ПЦР.

Раствор для разбавления ПКО, ОКО, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 1,5 мл с закрывающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: ТЕ буфер.

3

КОПИЯ

Положительный контрольный образец, **ПКС-ЛЗН/ЛДР**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с заворачивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 6×7 см, состав: смесь синтетических РНК, полученных с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантными плазмидами рСенТ с встроенными специфическими фрагментами 5' не транскрируемой области (5'UTR) вируса ЛЗН и S-сегмента генома вируса ЛДР.

Внутренний положительный контроль выделения, **ВПК-В-РНК**, расфасован в пробирку из полипропилена объемом 0,5 мл с заворачивающейся крышкой, упакованную в полиэтиленовый пакет Zip-Lock размером 4×7 см, состав: синтетическая РНК, полученная с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантной плазмиды рСенТ со встроенным специфическим фрагментом ДНК.

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 60 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 48 определений, включая контрольные образцы.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вирусов лихорадки Западного Нила и долины Рифт основано на использовании метода мультиплексной одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) в одной микропробирке.

При амплификации с помощью ОТ-ПЦР-РВ используют четыре олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент 5' не транскрируемой области генома вируса лихорадки Западного Нила, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент генома вируса лихорадки долины Рифт.

два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих нуклеиновые кислоты (НК) внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих НК внутреннего положительного контроля выделения, а также четыре флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфических фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени. Постановка ОТ-ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32 (32М, 4Я)» (ИАИ РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (BioRad, США), или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ» реализует преимущества мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в части одновременного выявления в одной пробе РНК двух вирусов, а также двух контролей анализа по разным каналам детекции флуоресценции. Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: **FAM** – внутренний положительный контроль выделения РНК; **ROX** – вирус лихорадки долины Рифт; **ROX** – вирус лихорадки Западного Нила; **Cy5** – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК вирусов лихорадки Западного Нила и/или долины Рифт. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вирусов лихорадки Западного Нила и/или долины Рифт.

2.4 Ограничения метода

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

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

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ОТ-ПЦР-РВ или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутренних положительных контрольных образцов выделения РНК (ВПК-В-РНК) и ОТ-ПЦР-РВ (ВПК) (п. 8.3 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Сергиев Посад, Московская область) и ООО «Интел» (г. Москва) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – не менее $1,0 \cdot 10^1$ копий РНК в 1 микролитре пробы (копий·мл⁻¹). Данный показатель достигается при условии объема аликвоты исходного материала (пробы) не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов НК вирусов лихорадки Западного Нила и долины Рифт (4 известно положительных образца), а также НК вирусов Марбург, Эбола, Ласса, Мавунга, Хунин, ВЭЛ, клещевого и японского энцефалитов, денге, желтой лихорадки, ККГЛ, ТОРС; бактерий *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetii*, ДНК человека и грызунов, культур клеток Vero, GMK и BHK, а также РНК (27 известно отрицательных образцов) отсутствовали.

При проведении исследования наблюдалась полная внутрисетевая, межсетевая и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические исследования набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ Вектор (рп. Кольцово, Новосибирской области).

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – при исследовании 64 проб клеточных культур (вирусоносительная жидкость), 128 проб биологического материала и 96 проб членистоногих (288 положительных проб), содержащих вирусы лихорадки Западного Нила и лихорадки долины Рифт с концентрацией 1×10^1 копий/мл, положительный результат получен в 288 случаях. Диагностическая чувствительность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность – при исследовании 48 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (вирусы клещевого энцефалита, желтой лихорадки, японского энцефалита, денге, восточного энцефаломиелита лошадей) в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^1$ копий/мл, отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 48 случаях. Диагностическая специфичность – не менее 95 % с доверительной вероятностью 90 %.

При проведении исследований наблюдалась полная внутрисетевая, межсетевая и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусами лихорадки Западного Нила и долины Рифт проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), методических указаний «Организация работы лабораторий, использующих

методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности (МУ 1.3.2569-09), МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций» и методических указаний «Мероприятия по борьбе с лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации» (МУ 3.1.3.2600-10).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I-IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие preservar оператора

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ООО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл и на 20-200 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-вortex (например, «Циклотеп-901»), микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотеп-903»), штатив типа «IsoFreeze», штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ООО «Синтол»), штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл; холодильник на 2-8 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;
одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;
одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
набор реагентов для выделения ДНК/РНК;
ГЕ-буфер (кат. номер В-014, ООО «Синтол»);
отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
комплект средств для обработки рабочей зоны.

- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При попадании внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками: №1 – 490нм/520нм, №2 – 525нм/550нм, №3 – 550нм/580нм, №4 – 630нм/665нм, например, «АПК-32 (32М, 48)», CFX-96.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителя лихорадки Западного Нила и лихорадки Рифт, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб объектов окружающей среды, воздуха, насекомых, проб клинических образцов (цельной крови, сыворотки или плазмы крови, лейкоцитарной фракции крови, СМЖ), вирусосодержащей суспензии, а также проб биопсийного и аутопсийного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ забор проб крови и спинномозговой жидкости проводить в ранние сроки болезни (в период вирусемии). Для предотвращения свертывания кровь отбирают с ЭДТА либо цитратом натрия, использовать гепарин запрещается.

Отбор проб насекомых осуществляют в соответствии с МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций».

Пробы воздуха (биологического аэрозоля) отбирают с помощью специальных приборов, снабженных собирающей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 2 м³.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения НК используют зарегистрированные наборы реагентов сообразно происхождению проб. Для достижения показателей аналитической чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл. Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ».

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (ОК-В), который

потом обязательно анализируется в ОТ-ПЦР-РВ. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения НК

Для контроля выделения нуклеиновых кислот используют пробирку с **ВПК-В-РНК** из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-ЛЭН/ЛДР-РВ». Сухое содержимое **ВПК-В-РНК** разводят 500 мкл элюента из состава наборов реагентов для выделения и 10 мкл полученного раствора добавляют в пробирку с пробой непосредственно перед внесением сорбента. Регистрация роста сигнала по каналу **FAM** свидетельствует об успешном выделении РНК

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Пробы объектов окружающей среды, плазму и сыворотку крови хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С не более одного месяца, при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года, не допуская его оттаивания до проведения исследования. Образцы тканей хранят при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года.

При замораживании клинического материала его транспортировка также должна проводиться в замороженном состоянии. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов.

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителей лихорадок Западного Нила и долины Рифт, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами

12

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

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

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

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

- набор реагентов извлекают из холодильника. **РБ** и **ОКО** перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об/мин¹;

- помещают микропробирки в стрипы (**РС-ЛЭН/ЛДР**) в штатив для стрипов типа «IsoFreeze»[®] и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки: открывают крышки микропробирок и вносят в них по 1,5 мкл **РБ**;

- используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в микропробирки соответственно порядку исследования образцов по 20 мкл **ОКО**, **ОКО-В** и далее по 20 мкл растворов исследуемых образцов в необходимой повторяемости², закрывают крышки данных микропробирок;

- вносят в микропробирки соответственно маркировке по 20 мкл **ПКО-ЛЭН/ЛДР**, закрывают крышки данных микропробирок;

- перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об/мин³;

¹Примечание: До начала работы штатив рекомендуется охладить в бытовом холодильнике до температуры 2-8 °С

²Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях.

14

(СaufInH 2.1.7.2790-10).

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1 Процедура ириговления контрольных образцов

В пробирку с сухим содержимым **ПКО-ЛЭН/ЛДР** добавляют 200 мкл **ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об/мин⁴. Хранение разведенных препаратов **ПКО-ЛЭН/ЛДР** допускается при температуре не выше минус 20 °С.

7.2 Разведение препарата РНК (при необходимости)

Для выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт необходимо внести в реакцию 20 мкл препарата РНК. В случае необходимости, раствор препарата РНК разводят с помощью ТЕ-буфера (кат. номер В-014, ООО «Синтол»).

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

- одна микропробирка с **РС-ЛЭН/ЛДР**;

- 15 мкл **РБ**;

На каждый анализ расходуются:

- 20 мкл **ПКО-ЛЭН/ЛДР**;

- 20 мкл **ОКО**

8.2 Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводится в один этап:

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;

- вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 1 и вводят красители FAM, R64, ROX и Cy5;

13

ВНИМАНИЕ! После смешивания **РС-ЛЭН/ЛДР**, разбавителя и препарата РНК, микропробирки сразу установить в амплификатор и запустить ОТ-ПЦР-РВ.

Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования (таблица 2) и прикрывают крышки микропробирок;

Таблица 2 – Рекомендуемый порядок исследования образцов

№ образца	Содержимое
1	ПКО-ЛЭН/ЛДР
2	ПКО-ЛЭН/ЛДР
3	ОКО
4	ОКО
5	ОКО-В
6	ОКО-В
7	исследуемый образец (образец 1)
8	исследуемый образец (образец 1)
9	исследуемый образец (образец 2)
10	исследуемый образец (образец 2)
11	контроль

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

8.3 Процедура и измерения и оценки результатов анализа

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

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

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу R64; либо ROX относительно отрицательного контроля означает регистрацию роста сиг-

15

нала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов НК вирусов ЛЭН или ЛДР в данной микропробирке.

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

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

Учет результатов анализа (толкование характера реакций)

Результаты анализа не подлежат учету

- в случае регистрации роста сигнала ОКО по каналам R6G или ROX (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ПКО-ЛЭН/ЛДР по каналам R6G или ROX (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала по каналу Cy5*** (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

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

16

Таблица 3 – Интерпретация результатов анализа проб с помощью набора реагентов «ОМ-Сирин-ЛЭН/ЛДР-РВ»

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу			Образец	Интерпретация
ROX	R6G	Cy5		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев				
любой	любой	любой	ПКО	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
любой	любой	любой	ОКО-В	Ложноположительный результат, загрязнение и/или процесс выделения НК
любой	любой	любой	ОКО	Ложноположительный результат, загрязнение в ходе постановки ОТ-ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы				
любой	любой	любой	проба	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
любой	любой	любой	проба	Ложноположительный результат, недостаточная эффективность выделения
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов				
любой	любой	любой	ПКО	Набор реагентов специфичен в отношении НК вирусов ЛЭН и ЛДР
любой	любой	любой	ОКО-В	Загрязнения отсутствуют
любой	любой	любой	ОКО	В пробе не обнаружены НК вирусы ЛЭН и ЛДР
любой	любой	любой	проба	В пробе присутствуют НК вирусы ЛЭН
любой	любой	любой	проба	В пробе присутствуют НК вирусы ЛДР и ЛЭН

*Примечание: в случае добавления ВПК-Н-ПЧК на этапе выделения НК

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

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки ее результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например программа ANK_Shell версия 33 и выше, поставляемая с прибором «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 2.0 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

18

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ОКО по каналам R6G и ROX;
- в случае регистрации роста сигнала по каналу Cy5***, с любой величиной порогового цикла Ct;
- в случае регистрации роста сигнала ПКО-ЛЭН/ЛДР по каналам R6G и ROX, с любой величиной порогового цикла Ct.

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

Регистрация роста сигнала по каналу ROX в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома вируса лихорадки Западного Нила. Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения.

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

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

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

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 3.

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

17

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 9398-001-46395995-2013 - в сухом, защищенном от света месте, при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ОМ-Сирин-ЛЭН/ЛДР-РВ» должно производиться в соответствии с ТУ 9398-001-46395995-2013 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20 °С.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применительно не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для не вскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное. Срок годности разведенных препаратов ПКО-ЛЭН/ЛДР и ВПК-В-РНК не более месяца при температуре хранения не выше минус 20 °С.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, нуклеоничными, перчатками, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

19

10.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Скрип-ЛЗН/ЛДР-РВ» направлять на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495) 984-69-93, факс. (499) 977-74-55 E-mail: syntol@syntol.ru).

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

Научный директор ООО «Синтол»

Я.И. Алексеев

«___» _____ 201 г.

СОГЛАСОВАНО:

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

В.Н. Михеев

«___» _____ 201 г.



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 6 листов

Шесть листов

И.Л. Бурякина И.Л. Бурякина
происхо
должность, подпись

Уч. № 606

ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ

ПАСПОРТ

1	Наименование возбудителя, его таксономия	Вирус лихорадки долины Рифт сем. <i>Bunyaviridae</i>
2	Название штамма, его № или условное обозначение	Энтеббе
3	Кем, когда и от какого животного получен штамм	В Уганде в 1944 г.
4	История пассирования	Во ВНИИВВиМ 3 пассажа на белых мышах
5	Из какого учреждения получен данный штамм и дата его получения	Получен из ГУНИиЭПУ в 1974 г.
6	Производственный штамм в данное время или музейный	Вирулентный, музейный
7	Примененный способ стабилизации и хранения штамма в учреждении	Нативная гепаринизированная кровь инфицированных мышей. При -40°C
8	Периодичность освежения штамма	Один раз в 10 лет
9	Серологические свойства	Индукцирует образование ВН-, ЗГА-, П-антител
10	Патогенность для лабораторных, с.-х. животных и КЭ	Патогенен для мышей, золотистых хомячков, овец и коз
11	Чувствительность культур клеток	Не адаптирован
12	Дополнительные сведения о штамме	Штамм от 18.03.04г. Не контаминирован бактериями и грибами. Титр на мышах при внутрибрюшинном заражении $7,0 \lg \text{ЛД}_{50}/0,1 \text{ мл}; 0,5 \text{ мл/амп}$

Паспорт составили

В.М. Балышев
В.М. Балышев
А.Н. Жуков
А.Н. Жуков

Зав. Музеем штаммов

В.М. Балышев
В.М. Балышев

6. 04. 2004г.

Килин



П А С П О Р Т

1	Наименование возбудителя, его таксономия	Вирус лихорадки долины Рифт сем. Bunyaviridae, род Phlebovirus
2	Название штамма, его № или условное обозначение	RVF 2002/09- ПС (RVF-113/09-ПС)
3	Кем, когда и от какого животного получен штамм	Закутским Н.И., Лукшиным А.Л., Жестеревым В.И., Конаковой Л.Д., Балышевым В.М., Жуковым А.Н в 2002 г. из шт. RVF 113 путем адаптации и последующей селекции в к.к. почки сайги (ПС)
4	История пассирования	Прошел 9 селективных пассажей в культуре клеток ПС
5	Из какого учреждения получен данный штамм и дата его получения	Получен во ВНИИВВиМ в 2002г.
6	Производственный штамм в данное время или музейный	Аттенуированный музейный штамм, рекомендован для разработки инактивированной вакцины
7	Примененный способ стабилизации и хранения штамма в учреждении	Лиофил. культур. вирус аа лактозо(10%)-пептонный (10%) стабилизатор, при $t^0 - 40^0\text{C}$
8	Периодичность освежения штамма	Один раз в 5 лет, при активности выше $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ срок хранения продлевается
9	Серологические свойства	Индуктирует образование ВН-,ЗГА- антител
10	Патогенность для лабораторных, с.-х. животных и КЭ	Патогенен для мышей при интрацеребральном заражении
11	Чувствительность культур клеток	Размножается в культурах клеток ПЯ, ТЯ, ВНК-21, ПСГК, ПО, ПС.
12	Дополнительные сведения о штамме	Штамм 9-го пассажа в к.к. ПС от 14.04.05г. Не контаминирован бактериальной и грибной микрофлорой. Титр $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

Паспорт составили:

Вед. науч. сотр.

Мл. науч. сотр.

Закутский

Н.И. Закутский

А.Л. Лукшин

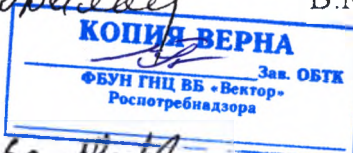
Зав.лаб. «Музей штаммов»:

Балышев

В.М. Балышев

Сдан в музей 30 апр.

2.03.2006г. *Лукшин*





В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 2 листов

Два листа

прописью

Зав. отд. И.В. Борзнев

должность, подпись

