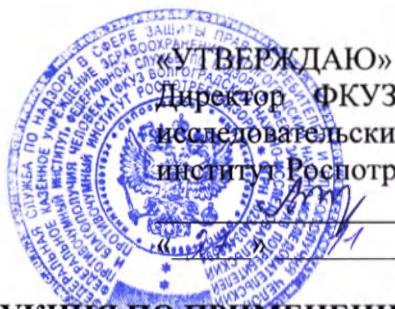




«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕНОТИПОВ (1, 2, 4) ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА (*WEST NILE VIRUS*) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ И ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ «АМПЛИГЕН-*WNV*-ГЕНОТИП-1/2/4» ПО ТУ 21.20.23-015-01898084-2019»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019», далее по тексту – набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» предназначен для качественного обнаружения РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила в пробах клинического материала методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» может быть использован для клинической лабораторной диагностики и проведения эпидемиологического мониторинга. В качестве клинического материала от человека могут быть использованы кровь, плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча, аутопсийный материал (головной мозг, печень, селезенка, почки).

Так же возможно применение МИ для исследования биологического материала от животных (головной мозг, печень, селезенка, почки, кровь), комаров и клещей.

Вирус Западного Нила (*WNV*, *West Nile virus*) принадлежит к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, антигенному комплексу вирусов японского энцефалита (*Japanese encephalitis virus group*). По принятой в Российской Федерации классификации патогенных биологических агентов *WNV* относят к вирусам II группы патогенности (опасности).

Вирус Западного Нила является возбудителем природно-очаговой арбовирусной инфекции с трансмиссивным механизмом передачи – лихорадки Западного Нила (ЛЗН). Природными резервуарами инфекции служат птицы, а в качестве основных переносчиков выступают орнитофильные комары, иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи. Заражение человека происходит при укусе комаров и клещей. Клинические проявления ЛЗН варьируют от гриппоподобного синдрома до развития тяжелых осложнений в форме менингита и менингоэнцефалита. В России достоверно зарегистрирована циркуляция 1, 2 и 4 генотипов *WNV*, имеющих разное эпидемическое значение. Так, штаммы *WNV* генотипов 1 и 2 являются высокопатогенными для человека, а патогенность *WNV* 4 генотипа для млекопитающих пока не установлена. РНК вируса Западного Нила (аналит) может быть обнаружена в инкубационный период, период острой фазы течения ЛЗН и период реконвалесценции.

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» используется в клинической лабораторной диагностике для исследования материала, полученного от лиц обоего пола, любого возраста с подозрением на ЛЗН вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (в анамнезе находившихся на эндемичных территориях по ЛЗН), а также в ходе эпидемиологического мониторинга.

*Введена впервые

Инструкция по применению «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» Страница 1 из 25

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Для проведения исследований могут быть использованы амплификаторы для ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени типа Rotor-Gene.

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 13 реагентов:

Таблица 1

Реагент	Описание	Объем (мл)	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	прозрачная жидкость с бледно-голубым оттенком	0,5	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО	прозрачная жидкость с бледно-голубым оттенком	0,5	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,25	3 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-3	прозрачная бесцветная жидкость	0,0375	1 пробирка
Ревертаза MMlv	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,0375	1 пробирка
<i>Taq-F</i> -ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,075	1 пробирка
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ВКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО выделения	прозрачная бесцветная жидкость	0,75	2 пробирки
ОКО ОТ-ПЦР	прозрачная бесцветная жидкость	0,45	1 пробирка

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» рассчитан на проведение 50 определений с учетом контрольных образцов.

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» позволяет обнаруживать специфические фрагменты РНК *WNV* посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и одновременно дифференцировать 1, 2 и 4 генотипы *WNV* на основании амплификации фрагмента гена полипротеина *WNV* (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) – представляет собой последовательное проведение двух процессов – реакции обратной транскрипции, в результате которой в присутствии фермента ревертазы MMlv по матрице РНК *WNV* осуществляется синтез кДНК *WNV*, и полимеразной цепной реакции, в ходе которой происходит амплификация специфической области кДНК-мишени *WNV* в присутствии *Taq-F* полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. При постановке ОТ-ПЦР применяется «горячий старт», обеспечивающийся использованием химически модифицированной *Taq*-полимеразы (*TaqF*-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин, что значительно снижает количество неспецифических реакций.

Детекция результатов осуществляется путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ОТ-ПЦР в режиме реального времени

(ОТ-ПЦР-РВ). По каналу *FAM/Green* детектируется продукт амплификации кДНК *WNV* 1 генотипа, по каналу *ROX/Orange* – продукт амплификации кДНК *WNV* 2 генотипа, по каналу *JOE/Yellow* – продукт амплификации кДНК *WNV* 4 генотипа. Продукты амплификации соответствуют нуклеотидной последовательности локуса *protC* гена полипротеина *WNV* (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок, определенного генотипа. По каналу *Cy5/Red* детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца).

Проведение анализа включает два этапа: 1) выделение нуклеиновых кислот из проб клинического и биологического материала и 2) проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на приборах типа Rotor-Gene. Тип используемых зондов – «молекулярные маяки». Область «петли» зонда комплементарна анализируемому продукту ОТ-ПЦР. В ходе реакции происходит гибридизация молекулярного маяка с ампликоном и расстояние между флуорофором и гасителем увеличивается, что приводит к повышению флуоресценции, которую фиксирует амплификатор. Учет результатов флуоресценции проводят по каждому каналу отдельно.

Ограничение метода. В инфицированном материале РНК *WNV* 1, 2 и 4 генотипов может быть не обнаружена по причине ингибирования ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения РНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения нуклеиновых кислот на уровне не менее 20%. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего контрольного образца (ВКО).

Причиной получения ложноотрицательных результатов ПЦР может быть наличие интерферирующих веществ (эндогенных, экзогенных). Для анализа потенциального влияния на работу набора реагентов интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале при проведении испытаний, использовалась кДНК, выделенная из контрольных образцов предприятия (СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4), не содержащих интерференты. Каждый образец был исследован в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл в двух повторах, с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, содержащихся в норме и превышающих верхнюю границу нормальной концентрации данных веществ в биологических образцах.

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов были проанализированы: гемоглобин, билирубин, холестерин, IgG, гепарин, ЭДТА, которые могут присутствовать в биоматериале (кровь, плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча, аутопсийный материал (головной мозг, печень, селезенка, почки), а также изопропиловый спирт, который может присутствовать в образце в результате несоблюдения правил пробоподготовки (таблица 2). Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться в норме при использовании набора реагентов, не влияют на его специфичность.

Таблица 2

N/n	Потенциально интерферирующие вещества	Тип интерферента	Верхняя граница нормы в образце	Протестированная концентрация интерферента в образце, превышающая верхнюю границу нормы	Наличие интерференции
1.	Гемоглобин	Эндогенный	170 г/л	250 г/л	Не обнаружено
2.	Общий билирубин	Эндогенный	21 мкмоль/л	210 мкмоль/л	Не обнаружено
3.	Холестерин	Эндогенный	7,8 ммоль/л	78 ммоль/л	Не обнаружено
4.	Ig G	Эндогенный	17 г/л	60 г/л	Обнаружено
5.	Гепарин	Экзогенный	от 12 до 30 МЕ/мл	30 МЕ/мл	Обнаружено

6.	ЭДТА	Экзогенный	от 1,2 до 2,0 мг/мл	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
7.	Изопропиловый спирт	Экзогенный	-	100 мкл/мл	Не обнаружено

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и реакции амплификации с набором реагентов, а также отсутствии влияния интерферирующих веществ предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО).

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения нуклеиновых кислот или на этапе проведения реакции ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов (ОКО выделения, ОКО ОТ-ПЦР).

Повторяемость и воспроизводимость.

Повторяемость и внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе лабораторных испытаний с использованием положительных стандартных образцов предприятия СОП кДНК *WNV-1*, СОП кДНК *WNV-2*, СОП кДНК *WNV-4* в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл каждый и отрицательных стандартных образцов предприятия - СОП кДНК *YFV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*), СОП кДНК *RUBV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл каждый, в 5 повторах на наборе одной серии.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе лабораторных испытаний с использованием положительных стандартных образцов предприятия СОП кДНК *WNV-1*, СОП кДНК *WNV-2*, СОП кДНК *WNV-4* в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл каждый и отрицательных стандартных образцов предприятия - СОП кДНК *YFV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*), СОП кДНК *RUBV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл каждый, на двух сериях набора реагентов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять и дифференцировать РНК/кДНК *WNV* 1, 2 и 4 генотипов в пробах с концентрацией не менее 1×10^4 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность.

Набор не должен давать положительных результатов с РНК/кДНК гетерологичных вирусов в пробах с концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл.

Диагностические характеристики.

Диагностические характеристики набора будут определены по результатам клинических испытаний.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

4.1 Информация об инфекционных или микробных рисках

Набор реагентов может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки биологических образцов и проведение ПЦР-анализа проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация

работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

4.2 Необходимость обучения персонала

Исследования на ЛЗН могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы профессиональной переподготовки с освоением методов безопасной работы с возбудителями инфекционных болезней I-IV групп патогенности (опасности), не имеющие противопоказаний к лечению специфическими препаратами и имеющие допуск к работе с ПБА на основании приказа руководителя организации.

4.3 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

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

- проводить работу с использованием средств индивидуальной защиты в соответствии с СанПиН 3.3686-21;
- использовать одноразовые перчатки без талька;
- этапы выделения РНК/кДНК проводить в боксах биологической безопасности II класса;
- подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов проводить в ПЦР-боксах;
- использовать одноразовые наконечники для автоматических дозаторов при различных операциях;
- сбрасывать использованные одноразовые расходные материалы (пробирки, наконечники), посуду в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство;
- удалять отходы с продуктами ПЦР только в закрытом виде, не допускается открывать пробирки после амплификации;
- осуществлять влажную уборку поверхностей рабочих столов, штативов, оборудования и др. до начала и после завершения работ с применением дезинфицирующих средств, обрабатывать помещения бактерицидными облучателями в соответствии с СанПин 3.3686-21.

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.

4.4 Информация об экологических рисках

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или серий с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

4.5 Информация о физических рисках, в том числе возможность взрыва или возгорания.

Набор реагентов следует применять по назначению в комбинации с приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

Набор реагентов не содержит материалов, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности набор реагентов является безопасным.

4.6 Информация о рисках применения, приводящих к ошибочному результату исследования:

- Использование набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» с истекшим сроком годности;

- Нарушение условий транспортирования, хранения набора реагентов;
- Нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора реагентов;
- Нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- Нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора реагентов;
- Нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов;
- Применение по назначению МИ в комбинации со средствами измерения, не прошедшими поверку и/или калибровку.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИЗДЕЛИЕМ*

Таблица 3

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа Rotor-Gene	Амплификатор «RotorGene Q», («QIAGEN», Германия), РУ № ФСЗ 2010/07595
Ламинарный-поточный шкаф II класса биологической безопасности	Ламинарно-поточный шкаф II класса биологической безопасности Biowizard Standard GL- 130, Kojair, Финляндия
ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-вортекс «Microspin FV-2400», НПФ ООО «BioSan», Латвия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, «ТЕРМО 48», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	Термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга «Mini-Spin», «Eppendorf», Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский «В-40», «Висма Планар» Беларусь
Холодильник	«MPR-214F» рабочий диапазон температур - основная камера от +2 до +14 °С, морозильная камера -20-30 °С, 220В, 155 Вт, «Sanyo», Япония
Дозатор 0,5-10 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 5-50 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 20-200 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 100-1000 мкл	ILS (CAPP), Дания
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
96-ти луночный алюминиевый штатив (для пробирок 0,2 мл)	«Corbett Research», Австралия; «QIAGEN», Германия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Интерлабсервис», Россия
Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Ахуген», США
Одноразовые наконечники с фильтром	ФСЗ 2012/11892 «Ахуген», США

до 20 мкл	
Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл.	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пестик для пробирок типа Eppendorf 1,5-2,0 мл	ФСЗ 2011/10287, «SSI», США
Ступка фарфоровая (№1)	ГОСТ 9147-80
Пестик фарфоровый (№1)	ГОСТ 9147-80
Порошок стеклянный марки ПС30	ГОСТ Р 52233-2004
Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008	ФСР 2008/03147, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Комплект реагентов для первого этапа выделения РНК из биологического материала «РИБО-золь-С» по ТУ 9398-074-01897593-2008	ФСР 2008/03148, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Одежда одноразовая медицинская из нетканого и полимерного материалов	РЗН 2013/668
Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора	ГОСТ Р 52239-2004
Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья	ГОСТ 5962-2013
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77

* Примечание: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследований на наличие возбудителя ЛЗН служат:

- 1) пробы клинического материала (образцы цельной крови, сыворотки и/или плазмы крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча);
- 2) пробы аутопсийного материала от человека (головной мозг, печень, селезенка, почки);
- 3) пробы биологического материала (кровь, суспензии органов животных, суспензии комаров, клещей).

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично завинчивающимися крышками в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы

амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

7.1 Подготовка исследуемых образцов

7.1.1 Подготовка проб клинического (биологического) материала

Кровь, плазма крови. Забор крови производят натошак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены в количестве 5-10 мл одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа «Vacuett» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 %-й раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Лейкоцитарная фракция цельной крови. Лейкоцитарную фракцию цельной крови следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5-2,0 мл. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Сыворотка крови. Для получения сыворотки забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в одноразовые пробирки без антикоагулянта. Пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Спинномозговая жидкость. Спинномозговую жидкость собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Предварительная обработка проб не требуется. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Моча. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-30 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50 мл. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10000 g, при наличии большого количества солей ресуспендируют только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрируют. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют 0,9% раствор хлорида натрия до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

7.1.2 Подготовка проб аутопсийного материала от человека

Аутоптаты органов. Кусочки ткани органов отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Для растирания кусочков органов используют либо

охлажденную стерильную ступку и пестик либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной охлажденной ступке кусочки органов массой до 10 г растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют охлажденный 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов массой 0,1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) охлажденного стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

7.1.3 Подготовка проб органов от животных, комаров и клещей

Биоптаты (аутоптаты) органов. Кусочки ткани органов животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Для растирания кусочков органов используют либо охлажденную стерильную ступку и пестик либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной охлажденной ступке кусочки органов массой до 10 г растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют охлажденный 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с закручивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов массой 0,1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) охлажденного стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

Комары и клещи. Предварительно формируют пулы комаров и клещей по видам. Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 %-го этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 g для удаления капель с крышки пробирки. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки. Вносят в пробирку 1 мл 0,9% раствор хлорида натрия, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3-5 с при 2000 g. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор хлорида натрия из пробирки. Переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7—1,0 мл 0,9% раствор хлорида натрия и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 g в течение 2 мин для осветления пробы. РНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

При выделении РНК из комаров используют данную методику обработки проб, за

исключением этапов отмывки в 96 %-м этаноле и 0,9% растворе хлорида натрия. Насекомых сразу гомогенизируют в стерильной ступке в 0,9% растворе хлорида натрия. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

7.2 Обеззараживание материала

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

7.3 Выделение нуклеиновых кислот

7.3.1 Выделение РНК из проб сыворотки и плазмы крови, а также спинномозговой жидкости, осуществляют с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. Работу проводят в соответствии с инструкцией к набору.

7.3.2 Выделение РНК из проб цельной крови, лейкоцитарной фракции крови, мочи, суспензий органов человека и животных, суспензий комаров и клещей проводят в 2 этапа. Для первого этапа выделения РНК из биологического материала используют коммерческий набор «РИБО-золь-С» по ТУ 9398-074-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичные. Для второго этапа выделения РНК используют коммерческий набор «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичные. Работу проводят в соответствии с инструкциями к наборам.

7.3.3 На этапе выделения РНК из исследуемых проб добавляют 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) в лизирующий раствор.

7.3.4 Дополнительно к исследуемым образцам на этапе экстракции РНК готовят отрицательный контроль выделения. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ОКО и 10 мкл ВКО.

7.4 Проведение ОТ-ПЦР

7.4.1 Подготовка реакционной смеси

Перед началом работы с набором из морозильной камеры извлекают ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3, ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4, ОКО и размораживают при комнатной температуре. Затем перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе. *Taq-F*-ДНК-полимеразу и Ревертазу MMlv извлекают из морозильной камеры и держат на холоде. Далее все реагенты центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок пробирки. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице (см. табл. 4). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца РНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного контроля (ПКО), отрицательного контроля выделения (ОКО выделения) и отрицательного контроля ОТ-ПЦР (ОКО ОТ-ПЦР) для каждого типа смеси.

Отбирают необходимое количество пробирок для «Rotor-Gene» объемом 0,1 или 0,2 мл с учетом количества исследуемых, контрольных образцов. Для приготовления реакционных смесей в отдельной стерильной пробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл смешивают одну из ОТ-ПЦР-смесей-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, или ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, или ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО), ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3, Ревертазу MMlv и *Taq-F*-ДНК-полимеразу согласно таблице 4. Пробирки для «Rotor-

Gene» подписывают сверху. Тщательно перемешивают смеси на вортексе и осаждают капли с крышек пробирок.

Вносят по 15 мкл подготовленной реакционной смеси в соответствующие микропробирки для «Rotor-Gene». Затем в пробирки для проб вносят по 10 мкл РНК проб. В контрольные пробирки вносят:

а) **отрицательный контроль выделения** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл образца, выделенного из регента **ОКО выделения**;

б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ОКО ОТ-ПЦР**;

в) **положительный контроль ПКО кДНК WNV генотип-1** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ПКО кДНК WNV генотип-1**;

г) **положительный контроль ПКО кДНК WNV генотип-2** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ПКО кДНК WNV генотип-2**;

д) **положительный контроль ПКО кДНК WNV генотип-4** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ПКО кДНК WNV генотип-4**.

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

Таблица 4

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		Объем реагентов на указанное количество реакций				
		10,00	5,00	0,25	0,25	0,50
Число исследуемых образцов	Число реакций	ОТ-ПЦР-смесь-1	ОТ-ПЦР-смесь-2	ОТ-ПЦР-смесь-3	Ревертаза MMlv	Taq-F-ДНК-полимераза
1	4	40	20	1,00	1,00	2,00
2	5	50	25	1,25	1,25	2,50
3	6	60	30	1,50	1,50	3,00
4	7	70	35	1,75	1,75	3,50
5	8	80	40	2,00	2,00	4,00
6	9	90	45	2,25	2,25	4,50
7	10	100	50	2,50	2,50	5,00
8	11	110	55	2,75	2,75	5,50
9	12	120	60	3,00	3,00	6,00
10	13	130	65	3,25	3,25	6,50
11	14	140	70	3,50	3,50	7,00
12	15	150	75	3,75	3,75	7,50
13	16	160	80	4,00	4,00	8,00
14	17	170	85	4,25	4,25	8,50
15	18	180	90	4,50	4,50	9,00
16	19	190	95	4,75	4,75	9,50
17	20	200	100	5,00	5,00	10,00
18	21	210	105	5,25	5,25	10,50
19	22	220	110	5,50	5,50	11,00
20	23	230	115	5,75	5,75	11,50
21	24	240	120	6,00	6,00	12,00

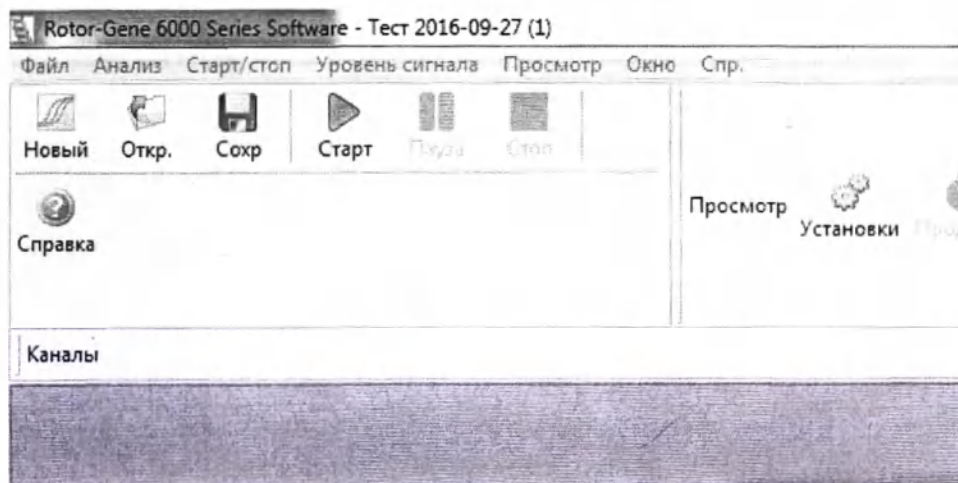
7.4.2 Проведение термоциклирования

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер «Rotor-Gene Q»

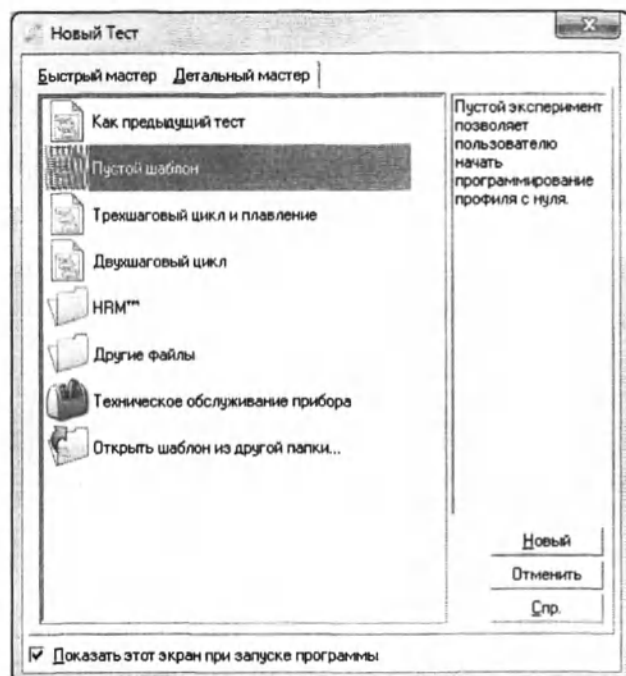
Программирование амплификатора Rotor-Gene:

Для работы с прибором «Rotor-Gene Q» следует использовать программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.

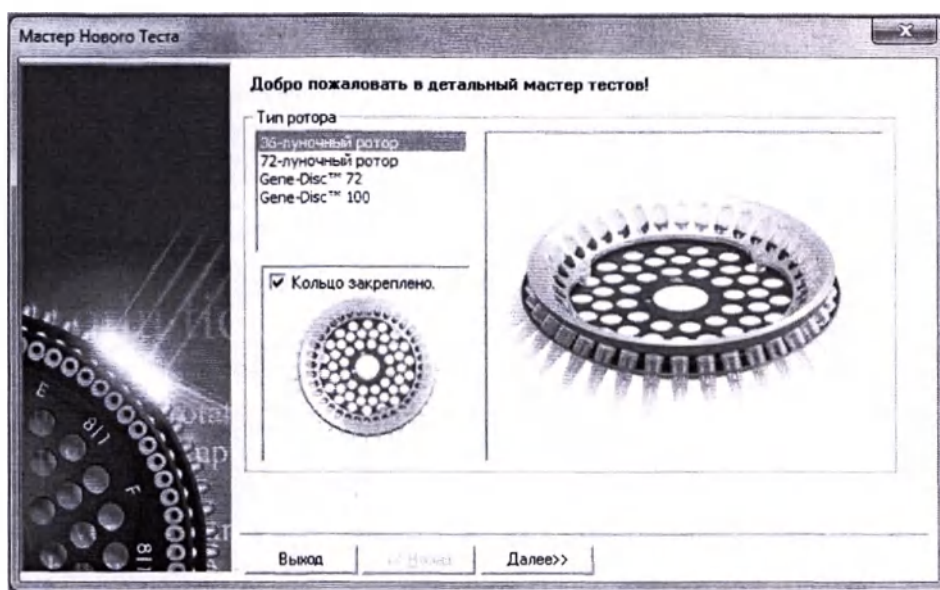


2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер». Нажимают кнопку «New»/«Новый».

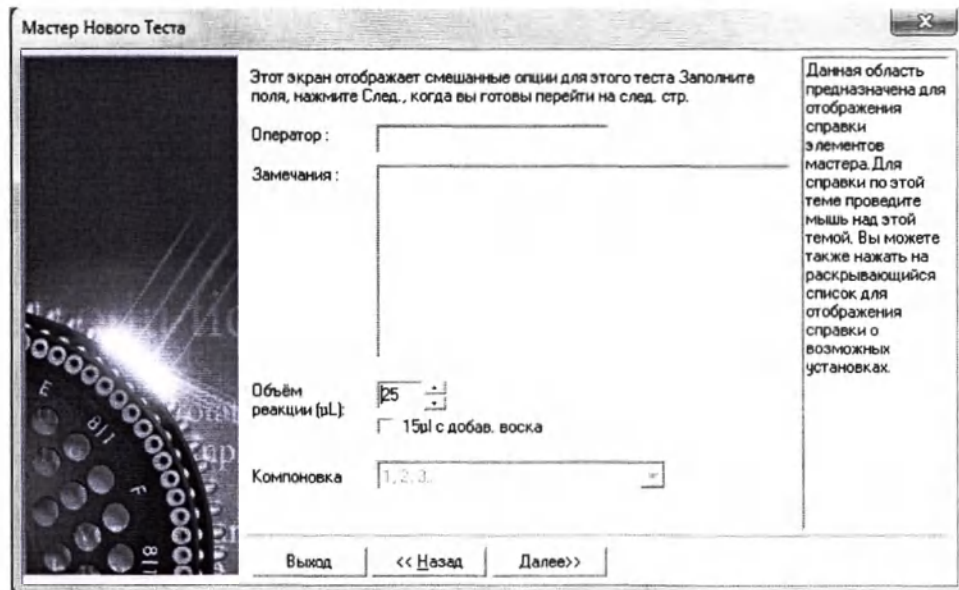


3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».

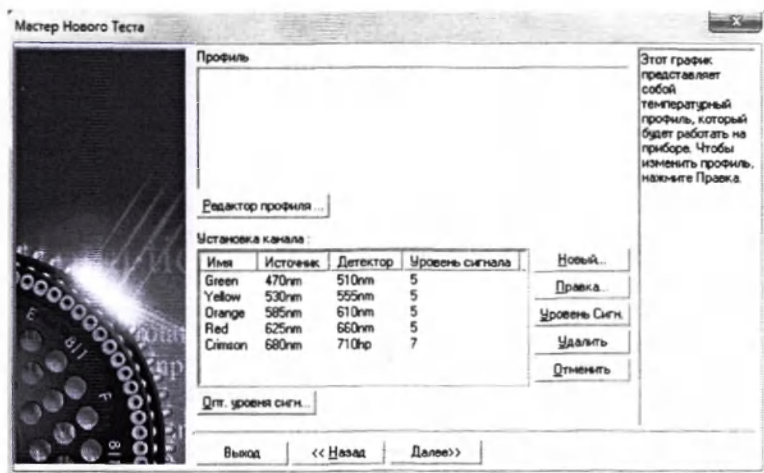
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



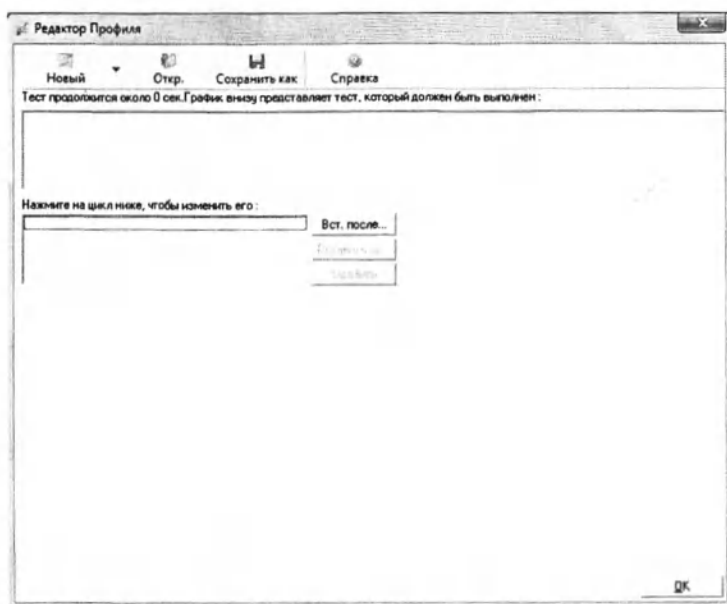
5. Выбирают объем реакционной смеси: «Reaction volume»/«Объем реакции» – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene Q» должно быть не активно (не отмечено галочкой) окно «15 μ L oil layer volume»/«15 μ L объем масла/воска».



6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».

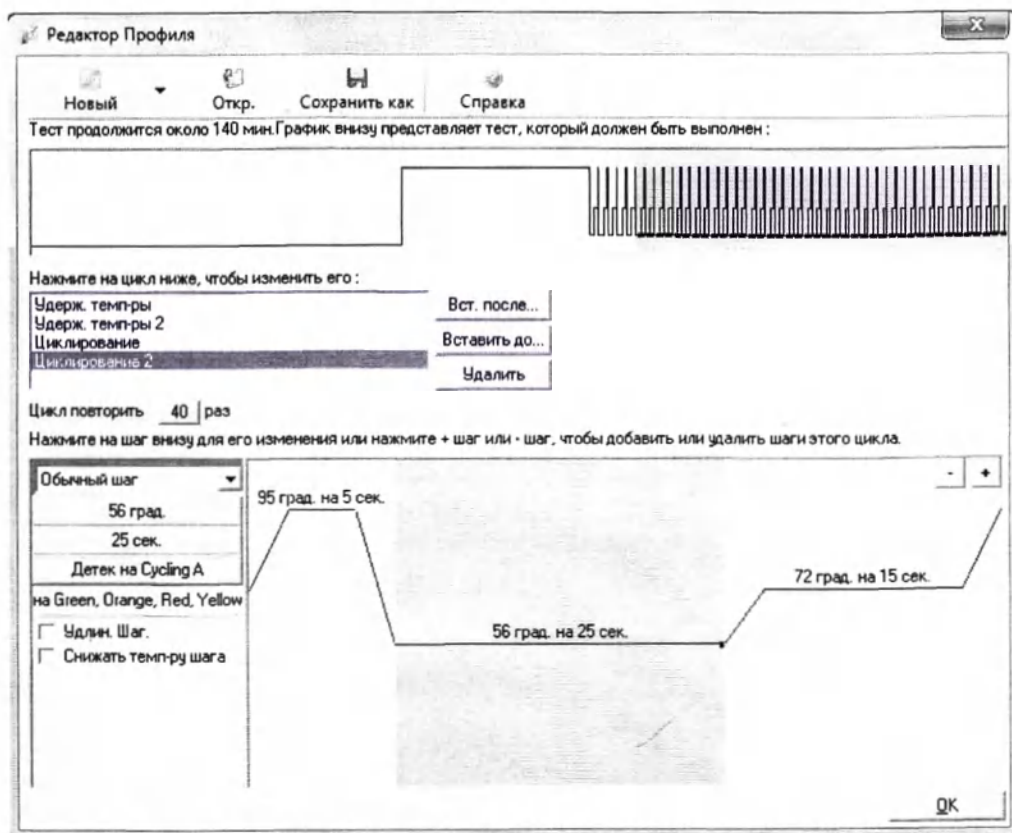


8. Задают следующие параметры (Таблица 5):

Таблица 5

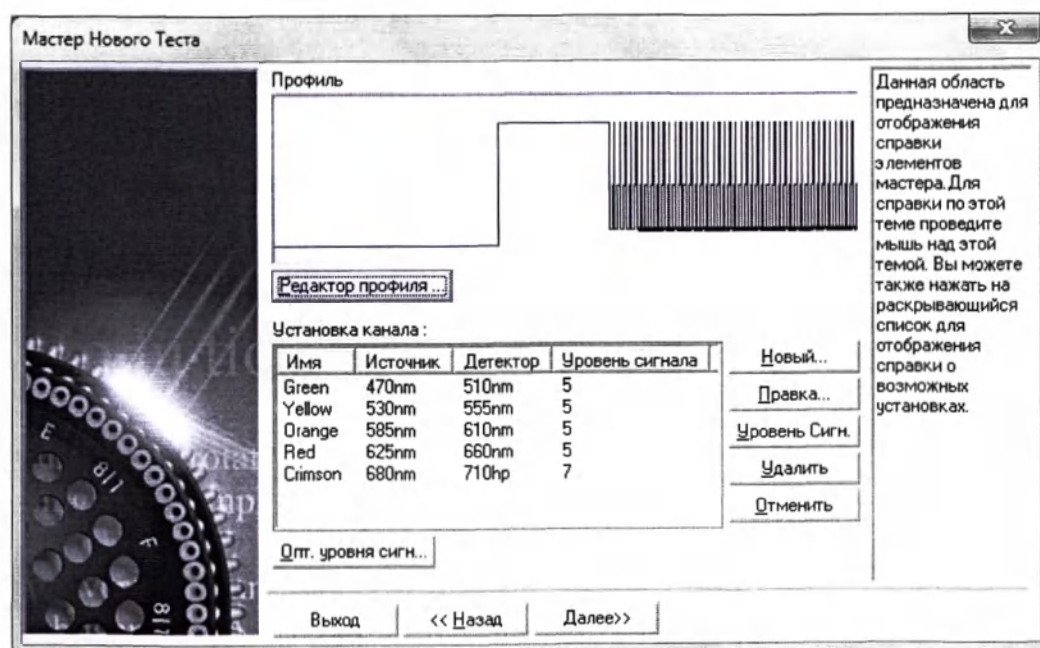
Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	5 с	-	5
	56	25 с	-	
	72	15 с	-	
4	95	5 с	-	40
	56	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	-	

Флуоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red



Нажимают кнопку «ОК»/«Да».

9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.».



В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт. детек-мыш».

Авто-оптимизация уровня сигнала

Оптимизация:

При авто-оптимизации уровня сигнала будет считываться флуоресцентный сигнал выбранной пробирки при различных уровнях усиления сигнала, пока не найдется уровень, при котором сигнал попадает в нужный диапазон. Уровень сигнала зависит от используемых реагентов.

Установить температуру градусов.

☐ Оптим. всех ☐ Опт. Детек-мыш

☐ Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции

☐ Выполнить оптимизацию при 60 градусах перед началом теста

Установки канала:

Имя	Позиция Пробирки	Миним. Сигнал	Максим. Сигнал	Мин. урое

Добавить...
Правка...
Удалить
Удалить Все

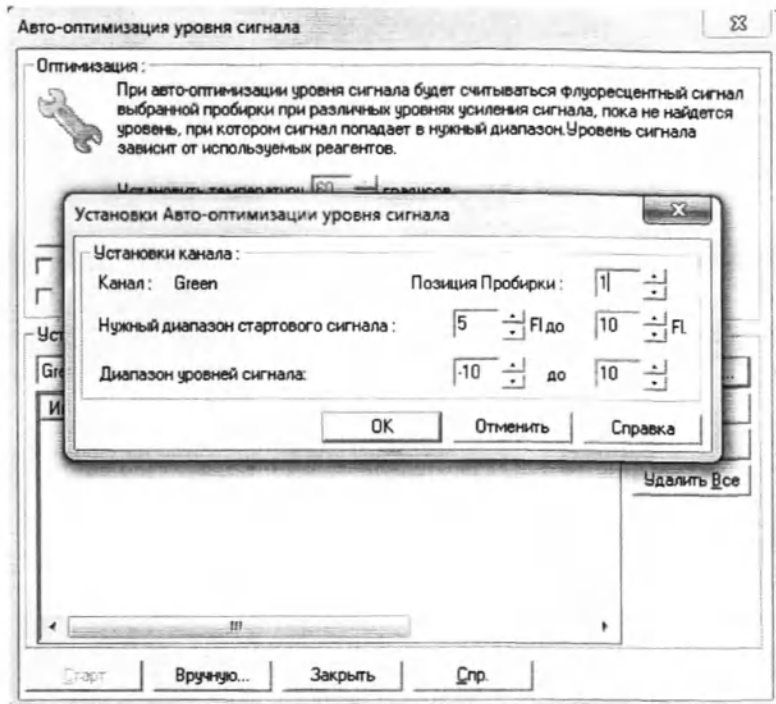
Старт Вручную... Закреть Спр.

- для красителя **FAM/Green** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «Tube position»/«Позиция пробирки» значение **1**;

- для красителя **JOE/Yellow** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «Tube position»/«Позиция пробирки» значение **3**;

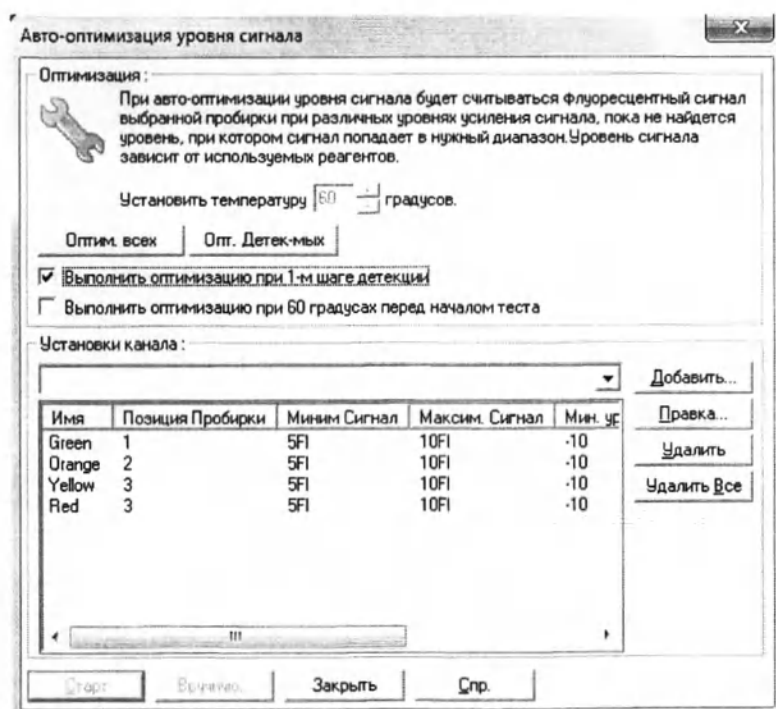
- для красителя **ROX/Orange** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «Tube position»/«Позиция пробирки» значение **2**;

- для красителя **Cy5/Red** указывают в графе «Min Reading»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «Max Reading»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «Tube position»/«Позиция пробирки» значение **3**.

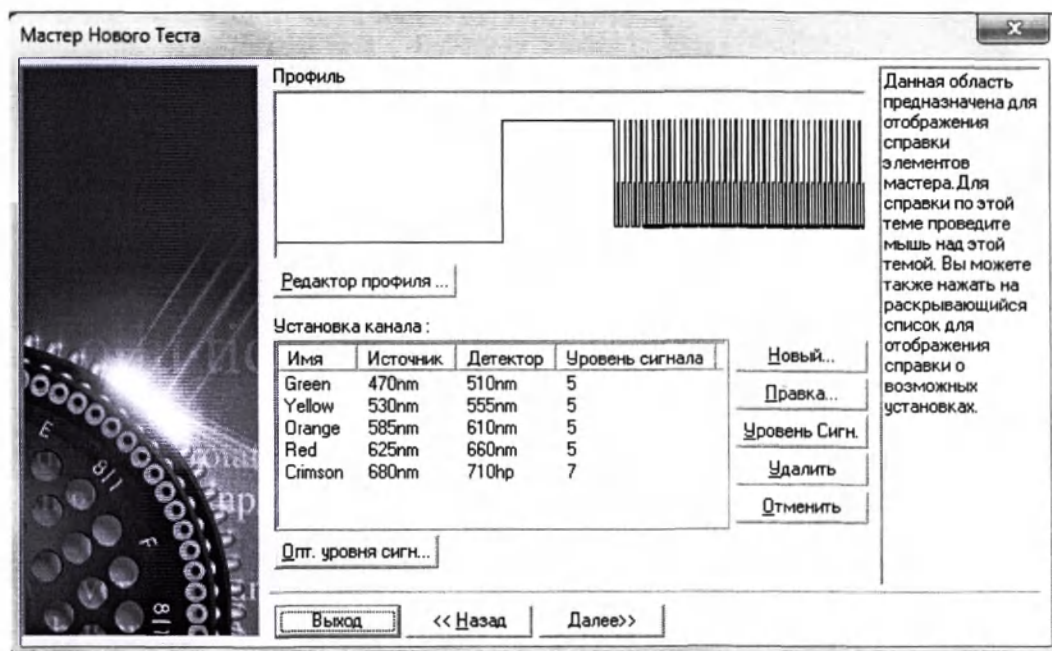


В графе «Tube position»/«Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «gain»/«усиление сигнала». В 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью ОТ-ПЦР-смесь-1 WNV генотип-1. Во 2-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью ОТ-ПЦР-смесь-1 WNV генотип-2. В 3-ей позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью ОТ-ПЦР-смесь-1 WNV генотип-4/ВКО.

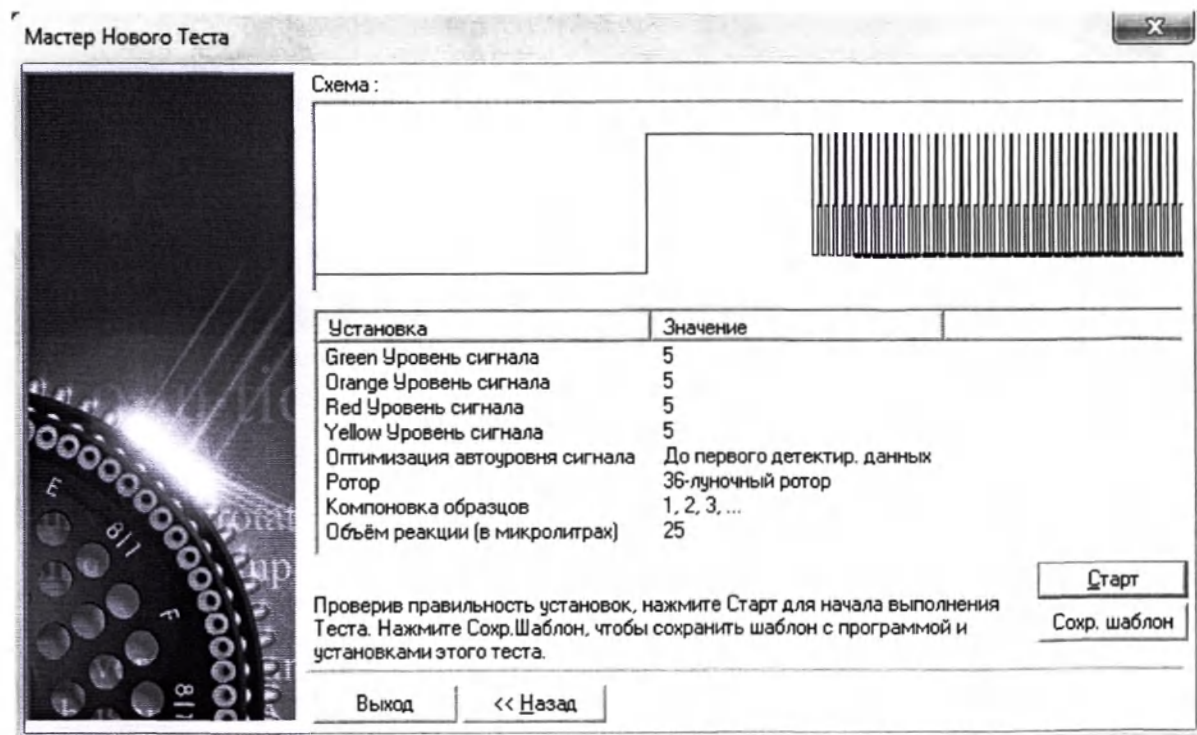
Помечают галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1st Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1st Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывают окно «Auto Gain Calibration Setup»/«Авто-оптимизация уровня сигнала», нажимают кнопку «Close»/«Заккрыть».



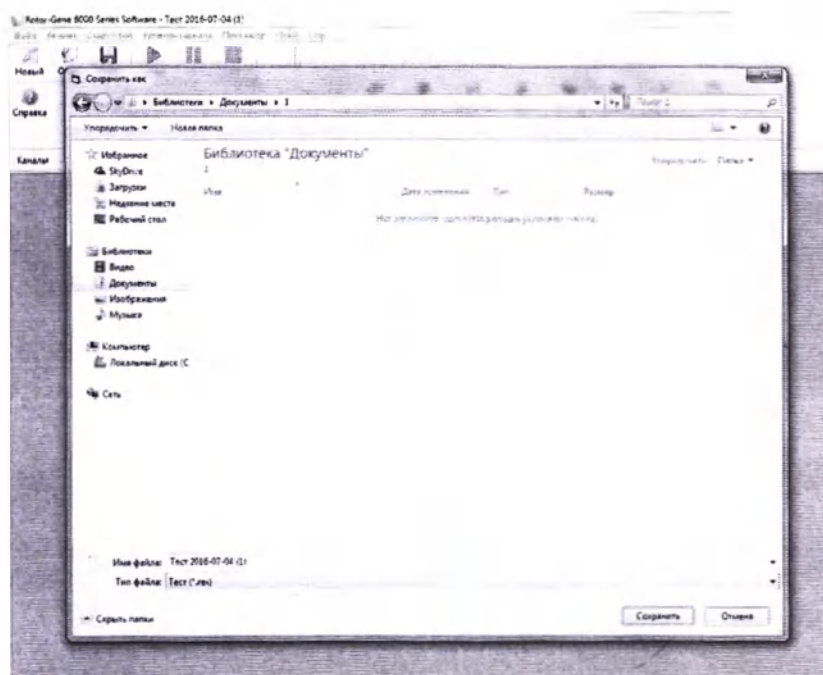
Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт». При необходимости введенные значения термоденатурации могут быть сохранены в качестве шаблона, используя кнопку «Save template»/«Сохр.шаблон».



11. Дают название эксперименту и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).



В процессе работы амплификатора или по окончании его работы программируют положение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «*Edit samples*»/«*Правка образцов*» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначают меню *Samples/Образцы* как *Unknown/Неизвестный*.

7.4.3 Анализ результатов

Регистрация результатов на приборах типа Rotor-Gene

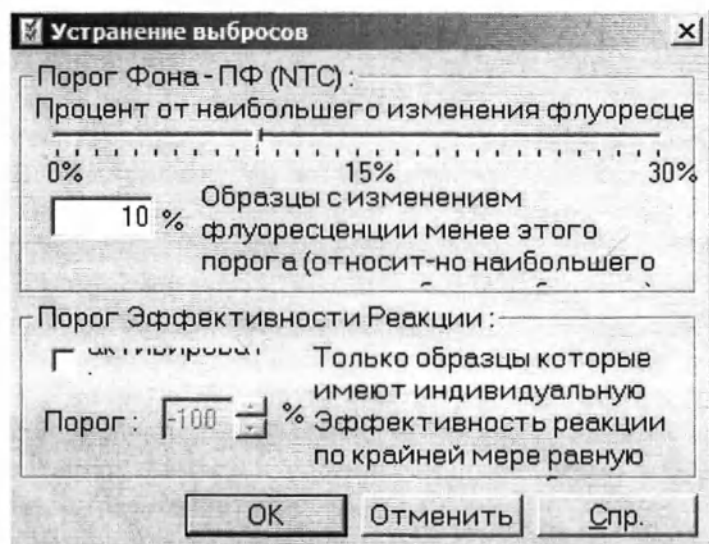
Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ОТ-ПЦР в режиме «реального времени». Для регистрации результатов амплификации на приборах типа Rotor-Gene используют следующие показатели (Таблица 6).

Таблица 6

Показатели	<i>Cy5</i> <i>Red</i>	<i>FAM</i> <i>Green</i>	<i>ROX</i> <i>Orange</i>	<i>JOE</i> <i>Yellow</i>
Наименование мишени	ВКО	<i>WNV</i> генотип-1	<i>WNV</i> генотип-2	<i>WNV</i> генотип-4
Функция « <i>Dynamic tube</i> »/ « <i>Динамич. фон</i> »	активна	активна	активна	активна
Функция « <i>Slope</i> <i>Correct</i> »/« <i>Коррек. уклона</i> »	активна	активна	активна	активна
Функция « <i>More</i> <i>settings</i> »/« <i>Outlier Removal</i> »/ « <i>Устранение выбросов</i> »	10 %	10 %	10 %	15 %
Значения <i>Threshold/Порог</i>	0,03	0,03	0,03	0,03

Регистрация результатов амплификации по каналу Cy5/Red:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. Cy5»/«Cycling A. Red», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку «Linear scale»/«Линейная шкала», в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение «NTC threshold»/«Порог Фона» – ПФ (NTC) – 10 %.



6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку «Linear scale»/«Линейная шкала», в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Cycling A. Orange», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку *Linear scale*/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение *NTC threshold*/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку *Linear scale*/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение *NTC threshold*/Порог Фона – ПФ (NTC) – 15 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

7.4.4 Учет результатов

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Вносят значения Ct, полученные по каждому из каналов в бланк, и проводят учет и интерпретацию результатов в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительных (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4) и отрицательных контролей (ОКО выделения и ОКО ОТ-ПЦР) и таблицы интерпретации данных анализа с использованием на приборах типа «Rotor-Gene».

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительных (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4) и отрицательных (ОКО выделения и ОКО ОТ-ПЦР) контролей амплификации (Таблица 7).

Таблица 7

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро- ли	Контро- лируе- мый этап исследо- вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/ Red</i>	<i>FAM/ Green</i>	<i>ROX/ Orange</i>	<i>JOE/ Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе- ния	Экстрак- ция нуклеи- нового материа- ла	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена

Принцип интерпритации результатов исследуемых проб представлен в таблице 8.

Таблица 8

Интерпретация данных анализа

Пробы	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
	<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
	детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
Исследуемые пробы	определено или отсутствует	$Ct < 35$	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена ; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
	определено или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct < 33$	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена ; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
	определено или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена
	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	Результат невалидный; необходимо повторить исследование

РНК/кДНК *WNV* 1 генотипа обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу *FAM/Green* определено значение порогового цикла $C_t < 35$, по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange* значения C_t отсутствуют или $C_t > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла C_t .

РНК/кДНК *WNV* 2 генотипа обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу *ROX/Orange* определено значение порогового цикла $C_t < 33$, по каналу *FAM/Green* значение C_t отсутствует или $C_t > 35$, по каналу *JOE/Yellow* – значение C_t отсутствует или $C_t > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла C_t .

РНК/кДНК *WNV* 4 генотипа обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу *JOE/Yellow* определено значение порогового цикла $C_t < 33$, по каналу *FAM/Green* значение C_t отсутствует или $C_t > 35$, по каналу *ROX/Orange* значение C_t отсутствует или $C_t > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла C_t .

РНК/кДНК *WNV* 1, 2, 4 генотипов не обнаружена если для данной пробы в таблице результатов по каналу *FAM/Green* не определено значение (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или $C_t > 35$, по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange* не определены значения (кривые флуоресценции не пересекают пороговую линию) или $C_t > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено значение C_t , не превышающее 33.

Пробы, для которых по каналу *FAM/Green* отсутствует или определено значение порогового цикла $C_t > 35$, по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange*, *Cy5/Red* отсутствуют или определены значения порогового цикла $C_t > 33$, результат анализа считают невалидным, требуется повторное проведение ОТ-ПЦР.

При повторном получении значения C_t более 35 по каналу *FAM/Green* и более 33 по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange*, *Cy5/Red* требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1 Условия хранения набора

Условия хранения компонентов набора реагентов ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3, Ревертаза *MMiv*, *Taq-F*-ДНК-полимераза, ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4, ВКО, ОКО выделения, ОКО ОТ-ПЦР – при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО хранить в защищенном от света месте.

8.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» осуществляют всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями ГОСТ 15150 и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования - при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С – неограниченно.

8.3 Срок годности и условия эксплуатации набора

Срок годности набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» – 9 месяцев при соблюдении условий хранения. Условия эксплуатации набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» – при температуре от 18 до 25 °С.

8.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, 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 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

Наборы с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы относятся к отходам класса Б и подлежат утилизации в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

Упаковки набора реагентов после использования по назначению, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Производитель - Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) (400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел. (8442) 37-37-74).

Зав. ОБТК, в.н.с.

ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора

Е.В. Прохвятилова

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор
ООО «Вымпел-Медцентр»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 25 ЛИСТОВ

11 2021 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Иванов П.К.



Прошито и пронумеровано

25 (двадцать пять) листов(а)

Зав. отд. делопроизводства
Чернова Е.А.

Подпись





«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

«04» исрга 2022 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕНОТИПОВ
(1, 2, 4) ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА (*WEST NILE VIRUS*) МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ И
ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ
«АМПЛИГЕН-*WNV*-ГЕНОТИП-1/2/4» ПО ТУ 21.20.23-015-01898084-2019»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Предназначение набора реагентов

«Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019», далее по тексту – набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» предназначен для качественного обнаружения РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила в пробах клинического материала методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

В качестве клинического материала от человека могут быть использованы кровь, плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча, аутопсийный материал (головной мозг, печень, селезенка, почки).

Так же возможно применение МИ для исследования биологического материала от животных (головной мозг, печень, селезенка, почки, кровь), комаров и клещей.

Для профессионального применения.

1.2 Область применения набора реагентов

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» может использоваться в клинической лабораторной диагностике ЛЗН, а также в ходе эпидемиологического мониторинга специалистами лабораторий: клинико-диагностических, медицинских, осуществляющих микробиологические, молекулярно-генетические исследования; специализированных по проведению санитарно-эпидемиологических исследований и экспертиз; референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней; центров индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности; центров верификации диагностической деятельности, научных лабораторий.

1.3 Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» используется для исследования материала, полученного от лиц обоего пола, любого возраста с подозрением на ЛЗН вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания (в анамнезе находившихся на эндемичных территориях по ЛЗН). РНК вируса Западного Нила (аналит) может быть обнаружена в инкубационный период, период острой фазы течения ЛЗН и период реконвалесценции.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях: нарушения внутренней упаковки или не соответствия описанию внешнего вида реагентов; несоблюдения условий транспортирования и хранения согласно инструкции; истекшего срока годности. Другие

*Введена впервые

Инструкция по применению «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» Страница 1 из 27

противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

1.4 Общая характеристика возбудителя ЛЗН

Вirus Западного Нила (*WNV*, *West Nile virus*) принадлежит к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, антигенному комплексу вирусов японского энцефалита (*Japanese encephalitis virus group*). По принятой в Российской Федерации классификации патогенных биологических агентов *WNV* относят к вирусам II группы патогенности (опасности).

Вirus Западного Нила является возбудителем природно-очаговой арбовирусной инфекции с трансмиссивным механизмом передачи – лихорадки Западного Нила (ЛЗН). Природными резервуарами инфекции служат птицы, а в качестве основных переносчиков выступают орнитофильные комары, иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи. Заражение человека происходит при укусе комаров и клещей. Клинические проявления ЛЗН варьируют от гриппоподобного синдрома до развития тяжелых осложнений в форме менингита и менингоэнцефалита. В России достоверно зарегистрирована циркуляция 1, 2 и 4 генотипов *WNV*, имеющих разное эпидемическое значение. Так, штаммы *WNV* генотипов 1 и 2 являются высокопатогенными для человека, а патогенность *WNV* 4 генотипа для млекопитающих пока не установлена.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Для проведения исследований могут быть использованы амплификаторы для ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени типа Rotor-Gene.

Компоненты набора являются одноразовыми. В состав набора входят 13 реагентов:

Таблица 1

Реагент	Описание	Объем (мл)	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	прозрачная жидкость с бледно-голубым оттенком	0,5	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО	прозрачная жидкость с бледно-голубым оттенком	0,5	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,25	3 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-3	прозрачная бесцветная жидкость	0,0375	1 пробирка
Ревертаза MMlv	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,0375	1 пробирка
<i>Taq-F</i> -ДНК-полимераза	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,075	1 пробирка
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ВКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО выделения	прозрачная бесцветная жидкость	0,75	2 пробирки
ОКО ОТ-ПЦР	прозрачная бесцветная жидкость	0,45	1 пробирка

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» рассчитан на проведение 50 определений с учетом контрольных образцов.

Набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» позволяет обнаруживать специфические фрагменты РНК *WNV* посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и одновременно дифференцировать 1, 2 и 4 генотипы *WNV* на основании амплификации фрагмента гена полипротеина *WNV* (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) – представляет собой последовательное проведение двух процессов – реакции обратной транскрипции, в результате которой в присутствии фермента ревертазы MMV по матрице РНК *WNV* осуществляется синтез кДНК *WNV*, и полимеразной цепной реакции, в ходе которой происходит амплификация специфической области кДНК-мишени *WNV* в присутствии *Taq-F* полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. При постановке ОТ-ПЦР применяется «горячий старт», обеспечивающийся использованием химически модифицированной *Taq*-полимеразы (*TaqF*-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин, что значительно снижает количество неспецифических реакций.

Детекция результатов осуществляется путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). По каналу *FAM/Green* детектируется продукт амплификации кДНК *WNV* 1 генотипа, по каналу *ROX/Orange* – продукт амплификации кДНК *WNV* 2 генотипа, по каналу *JOE/Yellow* – продукт амплификации кДНК *WNV* 4 генотипа. Продукты амплификации соответствуют нуклеотидной последовательности локуса *protC* гена полипротеина *WNV* (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок, определенного генотипа. По каналу *Cy5/Red* детектируется продукт амплификации ВКО (внутреннего контрольного образца).

Проведение анализа включает два этапа: 1) выделение нуклеиновых кислот из проб клинического и биологического материала и 2) проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на приборах типа Rotor-Gene. Тип используемых зондов – «молекулярные маяки». Область «петли» зонда комплементарна анализируемому продукту ОТ-ПЦР. В ходе реакции происходит гибридизация молекулярного маяка с ампликоном и расстояние между флуорофором и гасителем увеличивается, что приводит к повышению флуоресценции, которую фиксирует амплификатор. Учет результатов флуоресценции проводят по каждому каналу отдельно.

Ограничение метода. В инфицированном материале РНК *WNV* 1, 2 и 4 генотипов может быть не обнаружена по причине ингибирования ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения РНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения нуклеиновых кислот на уровне не менее 20%. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего контрольного образца (ВКО).

Причиной получения ложноотрицательных результатов ПЦР может быть наличие интерферирующих веществ (эндогенных, экзогенных). Для анализа потенциального влияния на работу набора реагентов интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале при проведении испытаний, использовалась кДНК, выделенная из контрольных образцов предприятия (СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4), не содержащих интерференты. Каждый образец был исследован в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл в двух повторах, с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, содержащихся в норме и превышающих верхнюю границу нормальной концентрации данных веществ в биологических образцах.

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов были проанализированы: гемоглобин, билирубин, холестерин, IgG, гепарин, ЭДТА, которые могут присутствовать в биоматериале (кровь, плазма и сыворотка крови,

лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча, аутопсийный материал (головной мозг, печень, селезенка, почки), а также изопропиловый спирт, который может присутствовать в образце в результате несоблюдения правил пробоподготовки (таблица 2). Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться в норме при использовании набора реагентов, не влияют на его специфичность.

Таблица 2

N/n	Потенциально интерферирующие вещества	Тип интерферента	Верхняя граница нормы в образце	Протестированная концентрация интерферента в образце, превышающая верхнюю границу нормы	Наличие интерференции
1.	Гемоглобин	Эндогенный	170 г/л	250 г/л	Не обнаружено
2.	Общий билирубин	Эндогенный	21 мкмоль/л	210 мкмоль/л	Не обнаружено
3.	Холестерин	Эндогенный	7,8 ммоль/л	78 ммоль/л	Не обнаружено
4.	Ig G	Эндогенный	17 г/л	60 г/л	Обнаружено
5.	Гепарин	Экзогенный	от 12 до 30 МЕ/мл	30 МЕ/мл	Обнаружено
6.	ЭДТА	Экзогенный	от 1,2 до 2,0 мг/мл	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
7.	Изопропиловый спирт	Экзогенный	-	100 мкл/мл	Не обнаружено

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и реакции амплификации с набором реагентов, а также отсутствии влияния интерферирующих веществ предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО).

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения нуклеиновых кислот или на этапе проведения реакции ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов (ОКО выделения, ОКО ОТ-ПЦР).

Повторяемость и воспроизводимость.

Повторяемость и внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе лабораторных испытаний с использованием положительных стандартных образцов предприятия СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4 в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл каждый и отрицательных стандартных образцов предприятия - СОП кДНК *YFV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*), СОП кДНК *RUBV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл каждый, в 5 повторах на наборе одной серии.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе лабораторных испытаний с использованием положительных стандартных образцов предприятия СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4 в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл каждый и отрицательных стандартных образцов предприятия - СОП кДНК *YFV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*), СОП кДНК *RUBV* - стандартный образец предприятия кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл каждый, на двух сериях набора реагентов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Аналитическая чувствительность.

Набор должен выявлять и дифференцировать РНК/кДНК *WNV* 1, 2 и 4 генотипов в пробах с концентрацией не менее 1×10^4 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность.

Набор не должен давать положительных результатов с РНК/кДНК гетерологичных вирусов в пробах с концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл.

Диагностические характеристики.

В ходе клинических испытаний доказана диагностическая эффективность МИ «Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019».

Диагностические характеристики набора установлены в лабораторных условиях с применением 420 образцов клинического и биологического материала, из них:

- образцов клинического материала (положительных проб): 108 образцов клинического материала от пациентов, инфицированных *West Nile virus*; 36 образцов клинического материала от пациентов, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия *West Nile virus* (СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4);

- образцов биологического материала (положительных проб): 99 образцов биологического материала от животных, комаров и клещей, инфицированных *West Nile virus*; 33 образца биологического материала от животных и клещей, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия *West Nile virus* (СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4);

- образцов клинического материала (отрицательных проб): 54 образца клинического материала от пациентов, инфицированных *Dengue virus* 1, 2, 3 типов, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, *Neisseria meningitidis*; 18 образцов клинического материала от пациентов, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия *Yellow fever virus*, *Rubella virus* (СОП кДНК *YFV*, СОП кДНК *RUBV*);

- образцов биологического материала (отрицательных проб): 54 образца биологического материала от клещей, инфицированных *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, *Borrelia burgdorferi s.l.*; 18 образцов биологического материала от животных и комаров, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия *Yellow fever virus*, *Rubella virus* (СОП кДНК *YFV*, СОП кДНК *RUBV*).

Определение РНК и дифференциация генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) подтверждена с использованием метода сравнения, в качестве которого применялся метод секвенирования по Сенгеру, заключающийся в определении нуклеотидных последовательностей с помощью Генетического анализатора «НАНОФОР 05» и программного обеспечения Unipro UGENE.

Диагностическая чувствительность - не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90% при анализе 276 положительных образцов (108 образцов клинического материала от человека, инфицированных *West Nile virus*; 36 образцов клинического материала от человека, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия *West Nile virus* в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл; 99 образцов биологического материала от животных, комаров и клещей, инфицированных *West Nile virus*; 33 образца биологического материала от животных и клещей, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия *West Nile virus* в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл), содержащих РНК/кДНК *West Nile virus* был получен положительный результат в 276 случаях.

Диагностическая специфичность - не менее 99 % с доверительной вероятностью 90% при исследовании 144 отрицательных образцов (54 образца клинического материала от человека, инфицированного *Dengue virus* 1, 2, 3 типов, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, *Neisseria meningitidis*; 18 образцов клинического материала от человека, искусственно контаминированного стандартными образцами предприятия *Yellow fever virus*, *Rubella virus* в

концентрации 1×10^6 ГЭ/мл; 54 образца биологического материала от клещей, инфицированного *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, *Borrelia burgdorferi* s.l.; 18 образцов биологического материала от животных и комаров, искусственно контаминированного стандартным образцом предприятия *Yellow fever virus* в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл) получен отрицательный ответ в 144 случаях.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

4.1 Информация об инфекционных или микробных рисках

Набор реагентов может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки биологических образцов и проведение ПЦР-анализа проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

4.2 Необходимость обучения персонала

Исследования на ЛЗН могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы профессиональной переподготовки с освоением методов безопасной работы с возбудителями инфекционных болезней I-IV групп патогенности (опасности), не имеющие противопоказаний к лечению специфическими препаратами и имеющие допуск к работе с ПБА на основании приказа руководителя организации.

4.3 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

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

- проводить работу с использованием средств индивидуальной защиты в соответствии с СанПиН 3.3686-21;
- использовать одноразовые перчатки без талька;
- этапы выделения РНК/кДНК проводить в боксах биологической безопасности II класса;
- подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов проводить в ПЦР-боксах;
- использовать одноразовые наконечники для автоматических дозаторов при различных операциях;
- сбрасывать использованные одноразовые расходные материалы (пробирки, наконечники), посуду в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство;
- удалять отходы с продуктами ПЦР только в закрытом виде, не допускается открывать пробирки после амплификации;
- осуществлять влажную уборку поверхностей рабочих столов, штативов, оборудования и др. до начала и после завершения работ с применением дезинфицирующих средств, обрабатывать помещения бактерицидными облучателями в соответствии с СанПин 3.3686-21.

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.

4.4 Информация об экологических рисках

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или серий с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

4.5 Информация о физических рисках, в том числе возможность взрыва или возгорания.

Набор реагентов следует применять по назначению в комбинации с приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

Набор реагентов не содержит материалов, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности набор реагентов является безопасным.

4.6 Информация о рисках применения, приводящих к ошибочному результату исследования:

- Использование набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» с истекшим сроком годности;
- Нарушение условий транспортирования, хранения набора реагентов;
- Нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора реагентов;
- Нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- Нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора реагентов;
- Нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов;
- Применение по назначению МИ в комбинации со средствами измерения, не прошедшими поверку и/или калибровку.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИЗДЕЛИЕМ*

Таблица 3

Наименование	Основные характеристики или обозначения документации, производитель
Амплификатор типа Rotor-Gene	Амплификатор «RotorGene Q», («QIAGEN», Германия), РУ № ФСЗ 2010/07595
Ламинарный-поточковый шкаф II класса биологической безопасности	Ламинарно-поточковый шкаф II класса биологической безопасности Biowizard Standard GL- 130, Kojair, Финляндия
ПЦР-бокс	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» «Ламинарные системы», Россия
Микроцентрифуга-встряхиватель	Микроцентрифуга-вортекс «Microspin FV-2400», НПФ ООО «BioSan», Латвия
Термостат твердотельный	Термостат твердотельный от 25 до 100 °С, «ТЕРМО 48», «Биоком», Россия
Термостат твердотельный с функцией охлаждения	Термостат твердотельный с функцией охлаждения от 4 до 120 °С, «Биоком», Россия
Микроцентрифуга настольная	Микроцентрифуга «Mini-Spin», «Eppendorf», Германия
Отсасыватель медицинский	Отсасыватель медицинский «В-40», «Висма Планар» Беларусь
Холодильник	«MPR-214F» рабочий диапазон температур - основная камера от +2 до +14 °С, морозильная

	камера -20-30 °С, 220В, 155 Вт, «Sanyo», Япония
Дозатор 0,5-10 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 5-50 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 20-200 мкл	ILS (CAPP), Дания
Дозатор 100-1000 мкл	ILS (CAPP), Дания
Штатив-подставка для дозаторов	Штатив-подставка для дозаторов универсальная на 5 дозаторов, «Хеликон», Россия
96-ти луночный алюминиевый штатив (для пробирок 0,2 мл)	«Corbett Research», Австралия; «QIAGEN», Германия
Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл	Штатив «рабочее место» для микропробирок на 1,5 мл, 5×10 мест с увеличенным расстоянием между лунками, «Интерлабсервис», Россия
Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 20 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Одноразовые наконечники с фильтром до 1000 мкл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Микроцентрифужные пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл.	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой	ФСЗ 2012/11892 «Axygen», США
Пестик для пробирок типа Eppendorf 1,5-2,0 мл	ФСЗ 2011/10287, «SSI», США
Ступка фарфоровая (№1)	ГОСТ 9147-80
Пестик фарфоровый (№1)	ГОСТ 9147-80
Порошок стеклянный марки ПС30	ГОСТ Р 52233-2004
Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008	ФСР 2008/03147, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Комплект реагентов для первого этапа выделения РНК из биологического материала «РИБО-золь-С» по ТУ 9398-074-01897593-2008	ФСР 2008/03148, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
Одежда одноразовая медицинская из нетканого и полимерного материалов	РЗН 2013/668
Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора	ГОСТ Р 52239-2004
Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья	ГОСТ 5962-2013
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77

* Примечание: допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Материалом для исследований на наличие возбудителя ЛЗН служат:

- 1) пробы клинического материала (образцы цельной крови, сыворотки и/или плазмы крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча);
- 2) пробы аутопсийного материала от человека (головной мозг, печень, селезенка, почки);
- 3) пробы биологического материала (кровь, суспензии органов животных, суспензии комаров, клещей).

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично завинчивающимися крышками в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С в течение 7 суток или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

7.1 Подготовка исследуемых образцов

7.1.1 Подготовка проб клинического (биологического) материала

Кровь, плазма крови. Забор крови производят натошак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены в количестве 5-10 мл одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа «Vacuett» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 %-й раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Лейкоцитарная фракция цельной крови. Лейкоцитарную фракцию цельной крови следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5-2,0 мл. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Сыворотка крови. Для получения сыворотки забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в одноразовые пробирки без антикоагулянта. Пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Спинномозговая жидкость. Спинномозговую жидкость собирают, используя

одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Предварительная обработка проб не требуется. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

Моча. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-30 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50 мл. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10000 g, при наличии большого количества солей ресуспендируют только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрируют. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют 0,9% раствор хлорида натрия до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

7.1.2 Подготовка проб аутопсийного материала от человека

Аутопаты органов. Кусочки ткани органов отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Для растирания кусочков органов используют либо охлажденную стерильную ступку и пестик либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной охлажденной ступке кусочки органов массой до 10 г растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют охлажденный 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов массой 0,1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) охлажденного стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

7.1.3 Подготовка проб органов от животных, комаров и клещей

Биопаты (аутопаты) органов. Кусочки ткани органов животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Для растирания кусочков органов используют либо охлажденную стерильную ступку и пестик либо микропробирки объемом 1,5 мл с пестиком для пробирок типа Eppendorf.

В стерильной охлажденной ступке кусочки органов массой до 10 г растирают до гомогенного состояния, после чего добавляют охлажденный 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Переносят по 1 мл пробы в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися крышками, используя наконечник с фильтром. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

В микропробирках объемом 1,5 мл кусочки органов массой 0,1 г растирают пестиками до гомогенного состояния, затем добавляют равный объем (не менее 100 мкл) охлажденного стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносят в отдельную микропробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Затем выполняют этапы обеззараживания материала (п. 7.2).

Комары и клещи. Предварительно формируют пулы комаров и клещей по видам.

Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 %-го этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 g для удаления капель с крышки пробирки. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки. Вносят в пробирку 1 мл 0,9% раствор хлорида натрия, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3-5 с при 2000 g. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор хлорида натрия из пробирки. Переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7—1,0 мл 0,9% раствор хлорида натрия и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 g в течение 2 мин для осветления пробы. РНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

При выделении РНК из комаров используют данную методику обработки проб, за исключением этапов отмывки в 96 %-м этаноле и 0,9% растворе хлорида натрия. Насекомых сразу гомогенизируют в стерильной ступке в 0,9% растворе хлорида натрия. Затем выполняют этап обеззараживания материала (п. 7.2).

7.2 Обеззараживание материала

Подготовленные для исследования пробы обеззараживают в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

7.3 Выделение нуклеиновых кислот

7.3.1 Выделение РНК из проб плазмы крови, а также спинномозговой жидкости, осуществляют с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Работу проводят в соответствии с инструкцией к набору.

7.3.2 Выделение РНК из проб цельной крови, сыворотки крови, лейкоцитарной фракции крови, мочи, суспензий органов человека и животных, суспензий комаров и клещей проводят в 2 этапа. Для первого этапа выделения РНК из биологического материала используют коммерческий набор «РИБО-золь-С» по ТУ 9398-074-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Для второго этапа выделения РНК используют коммерческий набор «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Работу проводят в соответствии с инструкциями к наборам.

7.3.3 На этапе выделения РНК из исследуемых проб добавляют 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) в лизирующий раствор.

7.3.4 Дополнительно к исследуемым образцам на этапе экстракции РНК готовят отрицательный контроль выделения. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ОКО и 10 мкл ВКО.

7.4 Проведение ОТ-ПЦР

7.4.1 Подготовка реакционной смеси

Перед началом работы с набором из морозильной камеры извлекают ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3, ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4, ОКО и размораживают при комнатной температуре. Затем перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе. *Taq-F*-ДНК-полимеразу и Ревертазу *MMIv* извлекают из морозильной камеры и держат на холоде. Далее все реагенты центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок

пробирки. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с аэрозольным барьером с помощью дозаторов переменного объема. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице (см. табл. 4). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца РНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ОТ-ПЦР (положительного контроля (ПКО), отрицательного контроля выделения (ОКО выделения) и отрицательного контроля ОТ-ПЦР (ОКО ОТ-ПЦР) для каждого типа смеси.

Отбирают необходимое количество пробирок для «Rotor-Gene» объемом 0,1 или 0,2 мл с учетом количества исследуемых, контрольных образцов. Для приготовления реакционных смесей в отдельной стерильной пробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл смешивают одну из ОТ-ПЦР-смесей-1 (ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, или ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, или ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО), ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3, Ревертазу MMlv и *Taq-F*-ДНК-полимеразу согласно таблице 4. Пробирки для «Rotor-Gene» подписывают сверху. Тщательно перемешивают смеси на вортексе и осаждают капли с крышек пробирок.

Вносят по 15 мкл подготовленной реакционной смеси в соответствующие микропробирки для «Rotor-Gene». Затем в пробирки для проб вносят по 10 мкл РНК проб. В контрольные пробирки вносят:

а) **отрицательный контроль выделения** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл образца, выделенного из регента **ОКО выделения**;

б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ОКО ОТ-ПЦР**;

в) **положительный контроль ПКО кДНК *WNV* генотип-1** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ПКО кДНК *WNV* генотип-1**;

г) **положительный контроль ПКО кДНК *WNV* генотип-2** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ПКО кДНК *WNV* генотип-2**;

д) **положительный контроль ПКО кДНК *WNV* генотип-4** – вместо РНК-пробы вносят 10 мкл реагента **ПКО кДНК *WNV* генотип-4**.

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

Таблица 4

		Объем реагентов на указанное количество реакций				
Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,25	0,25	0,50
Число исследуемых образцов	Число реакций	ОТ-ПЦР-смесь-1	ОТ-ПЦР-смесь-2	ОТ-ПЦР-смесь-3	Ревертаза MMlv	<i>Taq-F</i> -ДНК-полимераза
1	4	40	20	1,00	1,00	2,00
2	5	50	25	1,25	1,25	2,50
3	6	60	30	1,50	1,50	3,00
4	7	70	35	1,75	1,75	3,50
5	8	80	40	2,00	2,00	4,00
6	9	90	45	2,25	2,25	4,50
7	10	100	50	2,50	2,50	5,00
8	11	110	55	2,75	2,75	5,50
9	12	120	60	3,00	3,00	6,00
10	13	130	65	3,25	3,25	6,50
11	14	140	70	3,50	3,50	7,00

12	15	150	75	3,75	3,75	7,50
13	16	160	80	4,00	4,00	8,00
14	17	170	85	4,25	4,25	8,50
15	18	180	90	4,50	4,50	9,00
16	19	190	95	4,75	4,75	9,50
17	20	200	100	5,00	5,00	10,00
18	21	210	105	5,25	5,25	10,50
19	22	220	110	5,50	5,50	11,00
20	23	230	115	5,75	5,75	11,50
21	24	240	120	6,00	6,00	12,00

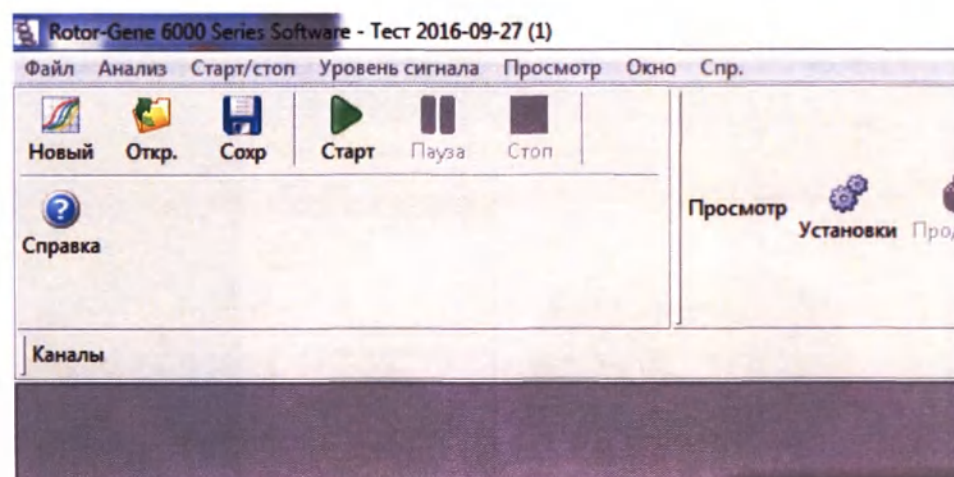
7.4.2 Проведение термоциклирования

Подготовленные микропробирки помещают в термоциклер «Rotor-Gene Q»

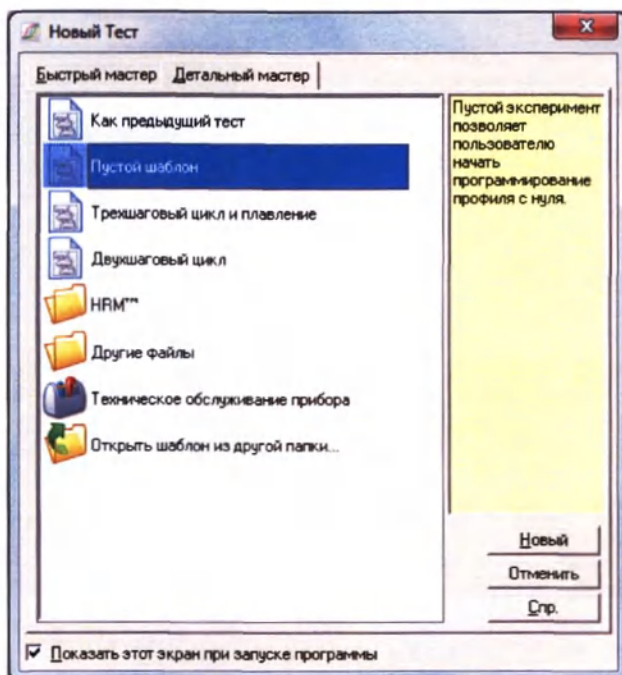
Программирование амплификатора Rotor-Gene:

Для работы с прибором «Rotor-Gene Q» следует использовать программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7 (build 67) или выше. При описании программы термины для каждой версии программы представлены следующим образом: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажимают кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.

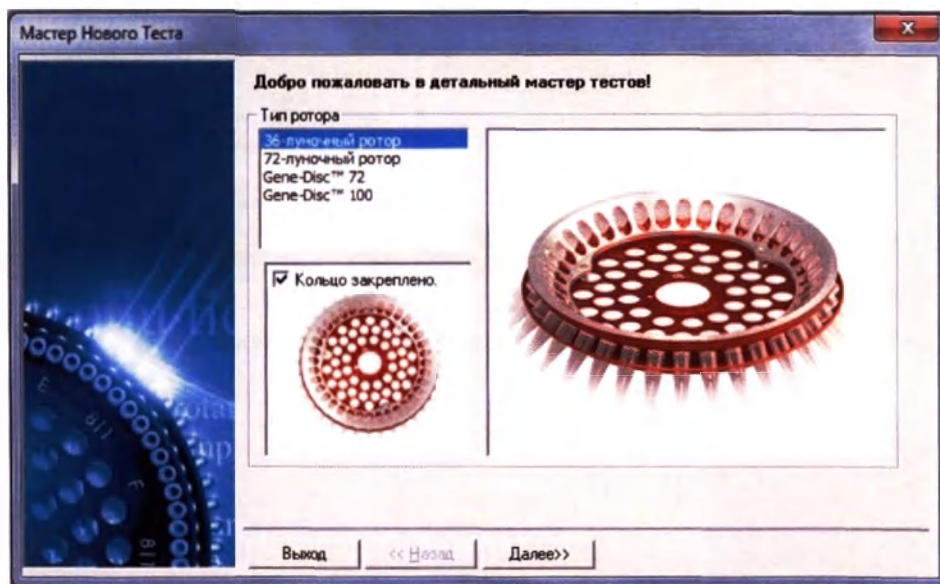


2. В открывшемся окне выбирают меню «Advanced»/«Детальный мастер» Нажимают кнопку «New»/«Новый».

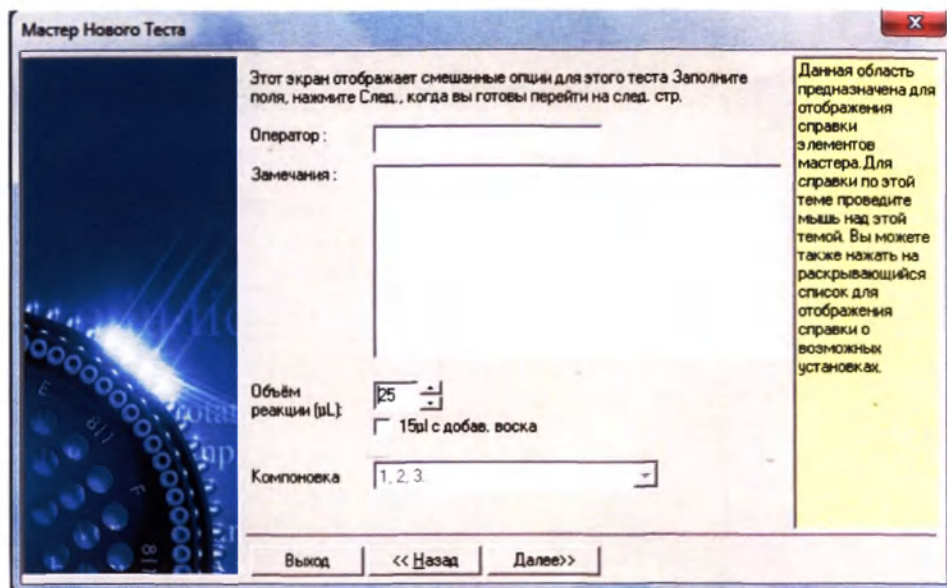


3. Выбирают тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Ставят отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».

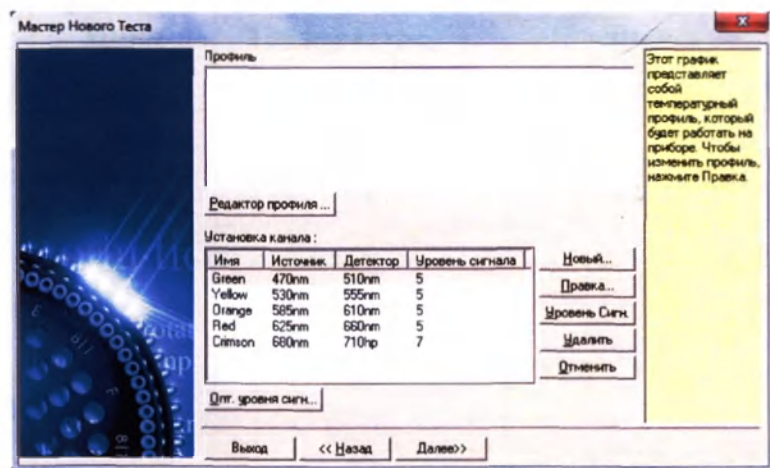
4. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



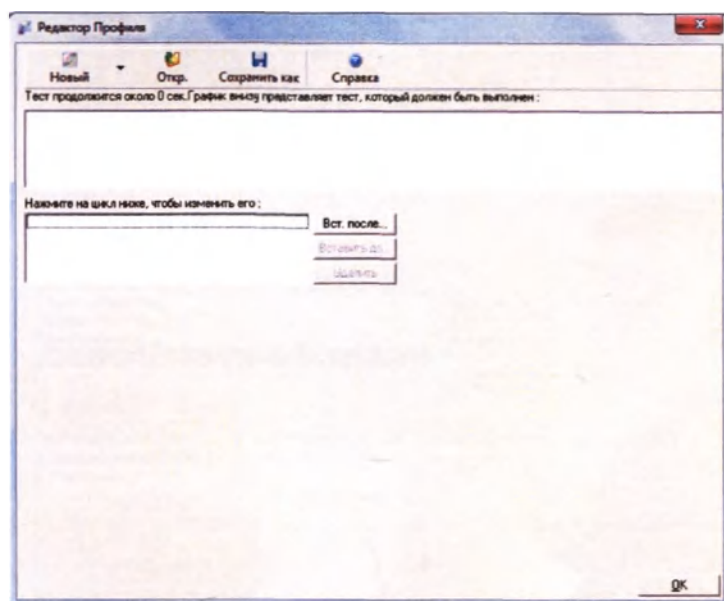
5. Выбирают объем реакционной смеси: «Reaction volume»/«Объем реакции» – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene Q» должно быть не активно (не отмечено галочкой) окно «15 μ l oil layer volume»/«15 μ L объем масла/воска».



6. Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



7. В верхней части окна нажимают кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».

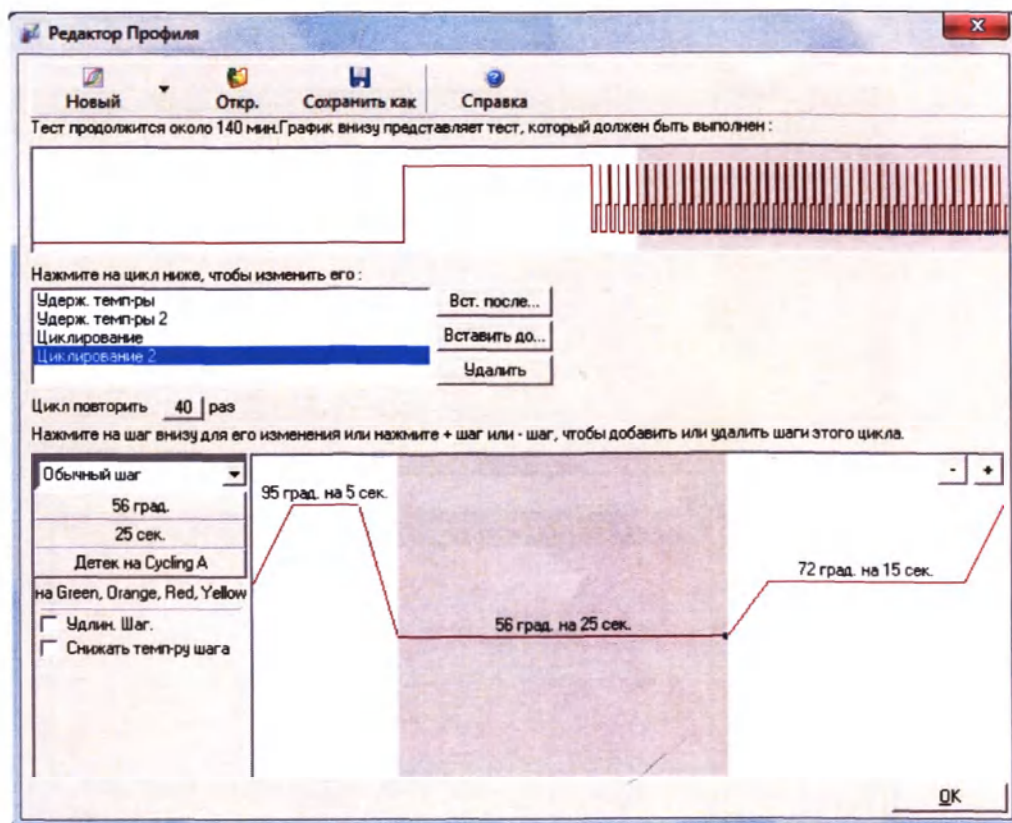


8. Задают следующие параметры (Таблица 5):

Таблица 5

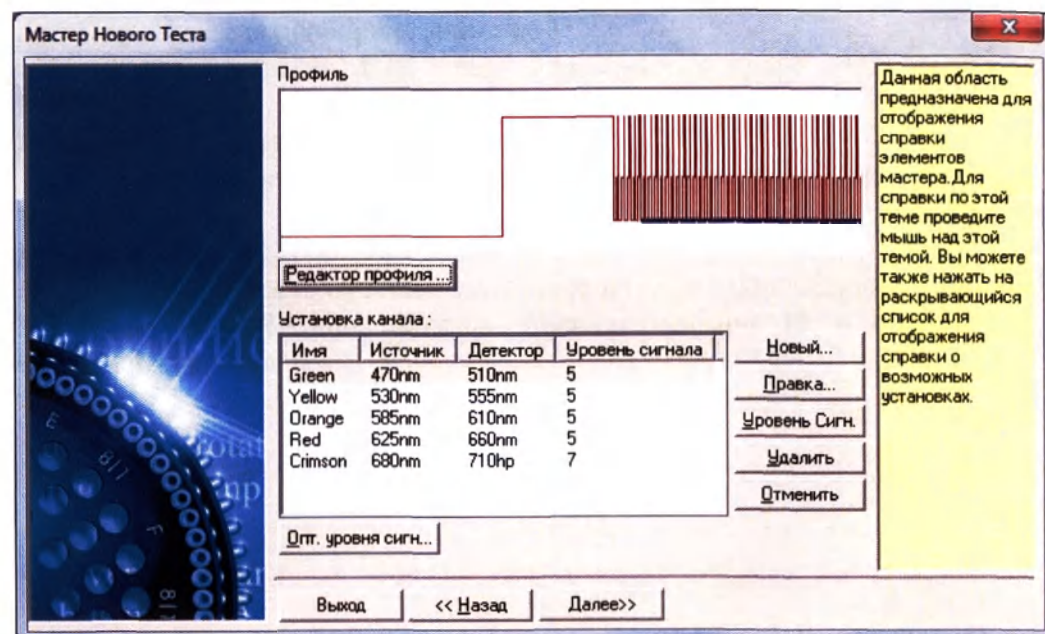
Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	5 с	-	5
	56	25 с	-	
	72	15 с	-	
4	95	5 с	-	40
	56	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	-	

Флуоресценцию измеряют при 56 °C (во втором блоке циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red

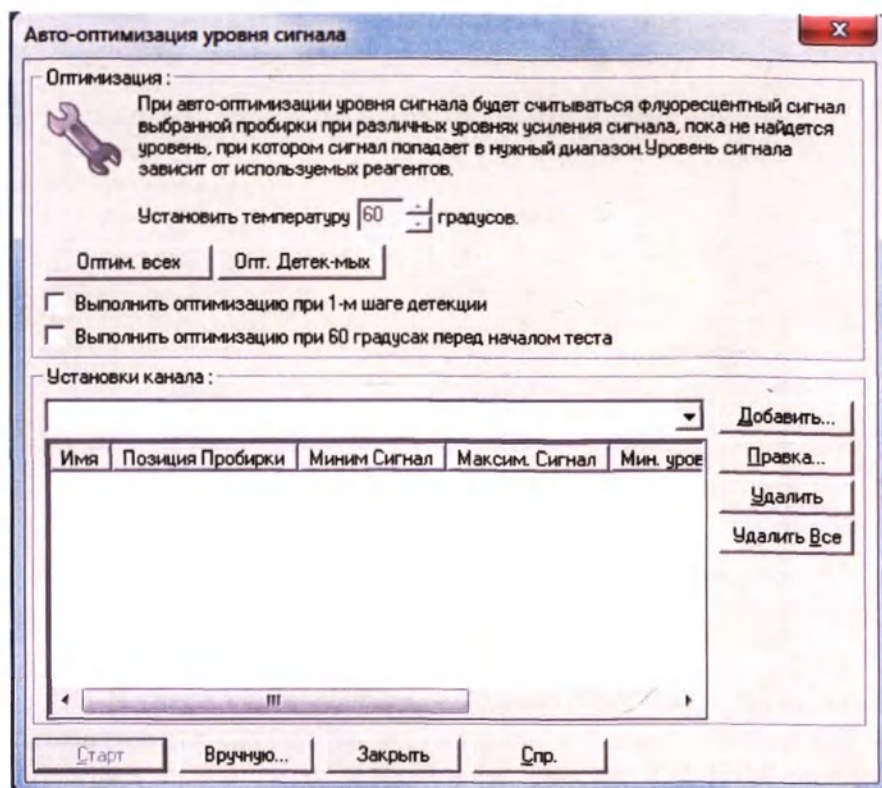


Нажимают кнопку «ОК»/«Да».

9. В нижней части окна нажимают кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.».



В открывшемся окне нажимают кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/

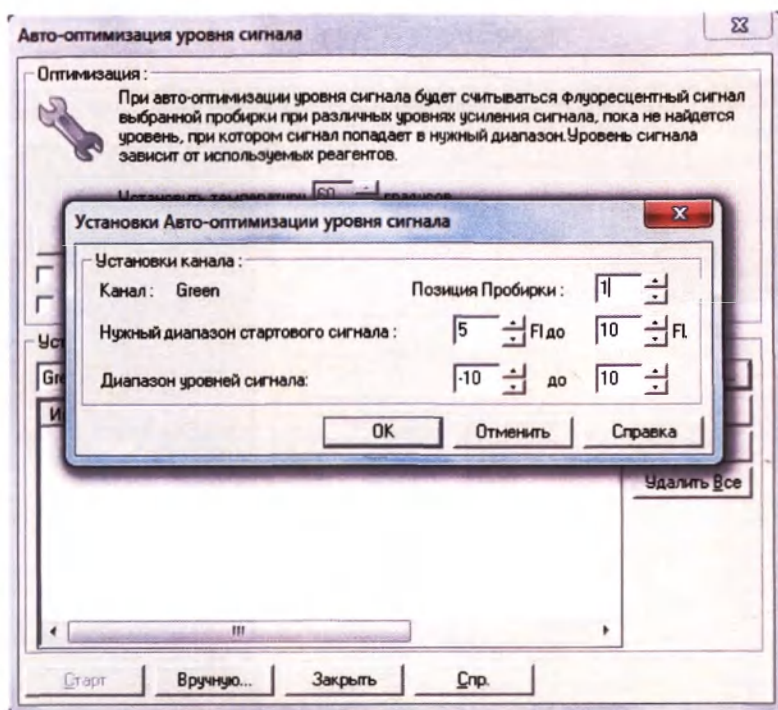


- для красителя **FAM/Green** указывают в графе «*Min Reading*»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, в графе «*Max Reading*»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «*Tube position*»/«Позиция пробирки» значение **1**;

- для красителя **JOE/Yellow** указывают в графе «*Min Reading*»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «*Max Reading*»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «*Tube position*»/«Позиция пробирки» значение **3**;

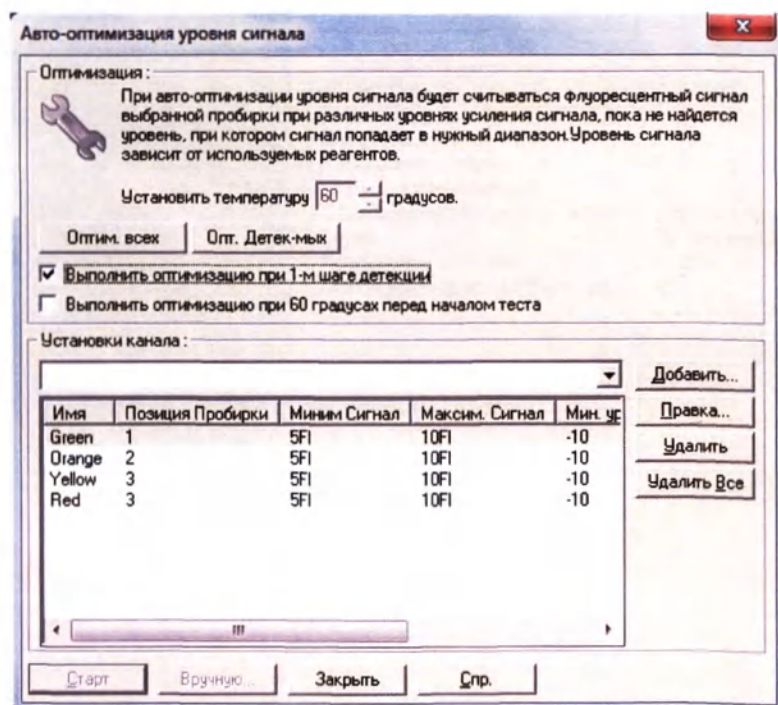
- для красителя **ROX/Orange** указывают в графе «*Min Reading*»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «*Max Reading*»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «*Tube position*»/«Позиция пробирки» значение **2**;

- для красителя **Cy5/Red** указывают в графе «*Min Reading*»/ «Миним. Сигнал» значение **5**, а в графе «*Max Reading*»/«Максим. Сигнал» значение **10**, в графе «*Tube position*»/«Позиция пробирки» значение **3**.

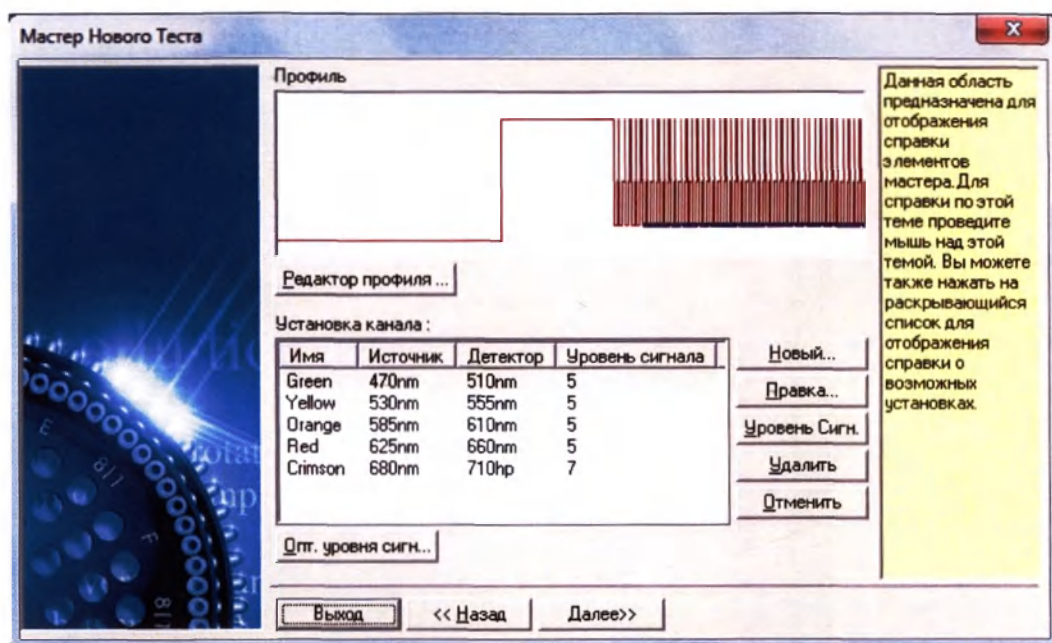


В графе «*Tube position*»/«Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «*gain*»/«усиление сигнала». В **1-ой позиции** в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью **ОТ-ПЦР-смесь-1 WNV** генотип-1. Во **2-ой позиции** в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью **ОТ-ПЦР-смесь-1 WNV** генотип-2. В **3-ей позиции** в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью **ОТ-ПЦР-смесь-1 WNV** генотип-4/ВКО.

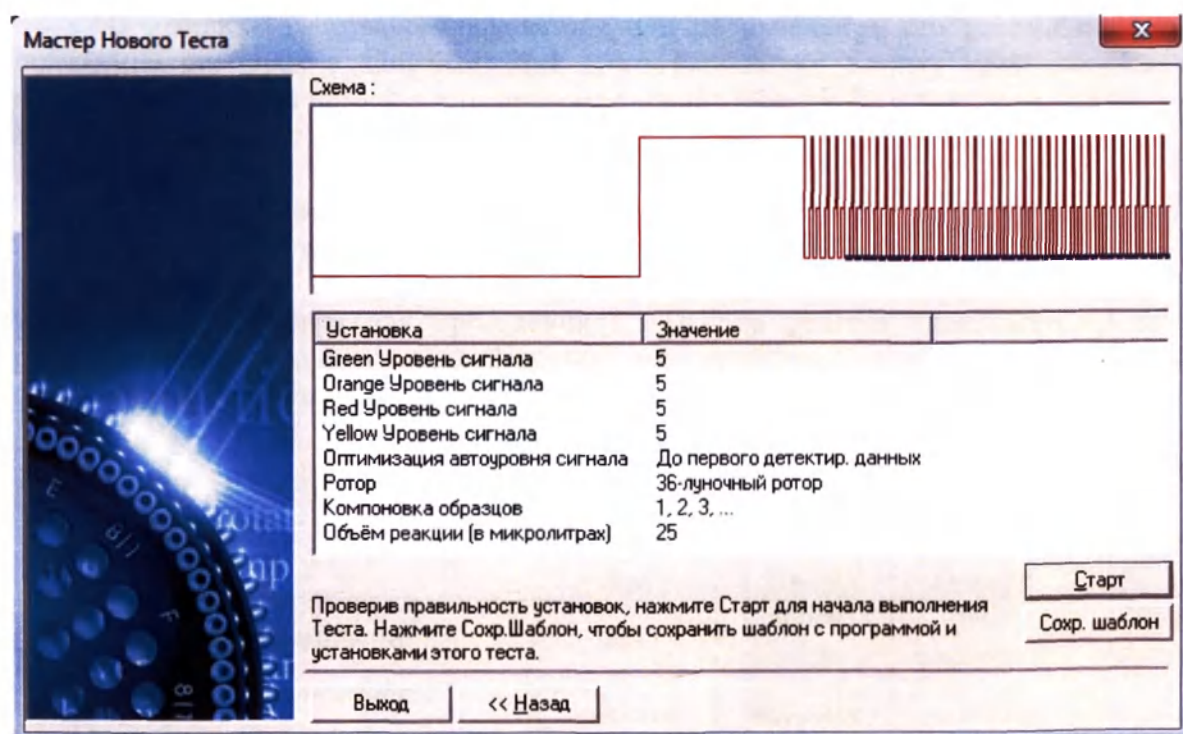
Помечают галочкой бокс в строке «*Perform Calibration Before 1st Acquisition*»/«*Perform Optimisation Before 1st Acquisition*»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрывать окно «*Auto Gain Calibration Setup*»/«Авто-оптимизация уровня сигнала», нажимают кнопку «*Close*»/«Закреть».



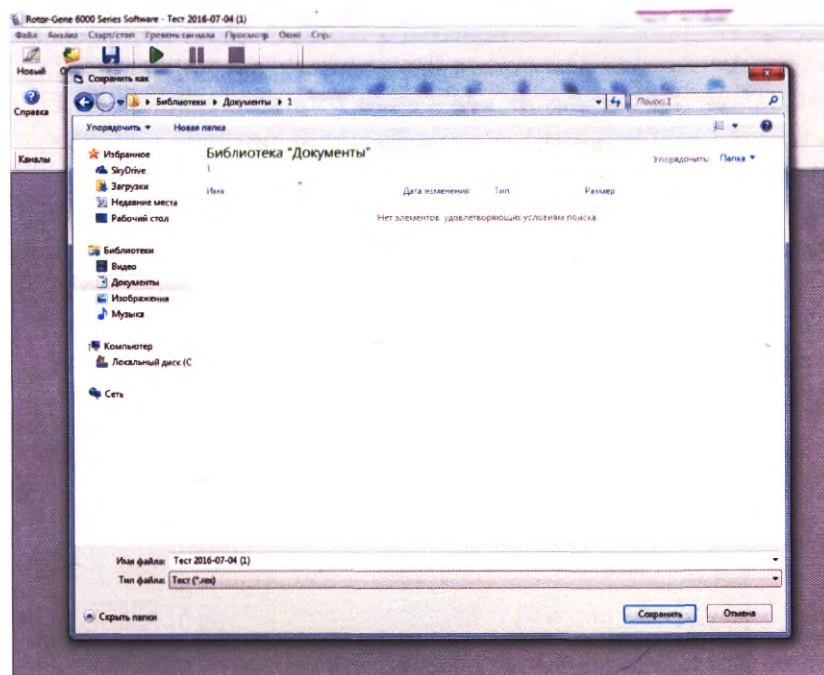
Нажимают кнопку «Next»/«Далее».



10. Запускают амплификацию кнопкой «Start run»/«Старт». При необходимости введенные значения термоциклирования могут быть сохранены в качестве шаблона, используя кнопку «Save template»/«Сохранить шаблон».



11. Дают название эксперимента и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).



В процессе работы амплификатора или по окончании его работы программируют положение пробирок в карусели. Для этого используют кнопку «*Edit samples*»/«*Правка образцов*» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначают меню *Samples/Образцы* как *Unknown/Неизвестный*.

7.4.3 Анализ результатов

Регистрация результатов на приборах типа Rotor-Gene

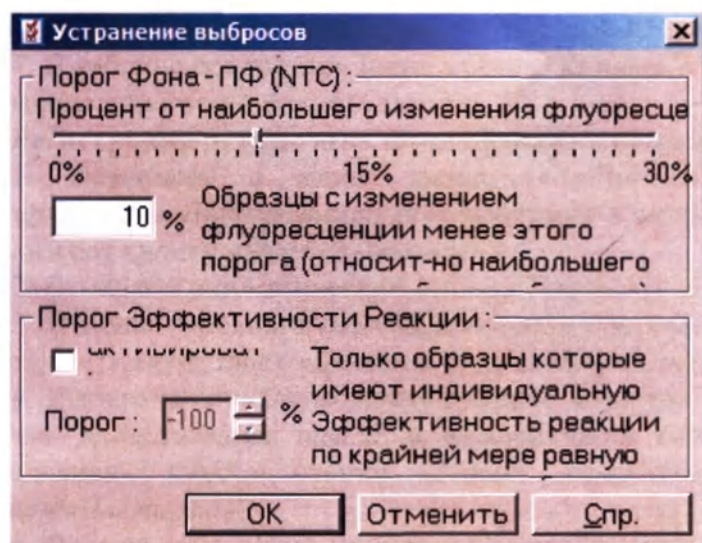
Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ОТ-ПЦР в режиме «реального времени». Для регистрации результатов амплификации на приборах типа Rotor-Gene используют следующие показатели (Таблица 6).

Таблица 6

Показатели	<i>Cy5 Red</i>	<i>FAM Green</i>	<i>ROX Orange</i>	<i>JOE Yellow</i>
Наименование мишени	ВКО	<i>WNV</i> генотип-1	<i>WNV</i> генотип-2	<i>WNV</i> генотип-4
Функция « <i>Dynamic tube</i> »/ « <i>Динамич. фон</i> »	активна	активна	активна	активна
Функция « <i>Slope Correct</i> »/« <i>Коррек. уклона</i> »	активна	активна	активна	активна
Функция « <i>More settings</i> »/« <i>Outlier Removal</i> »/ « <i>Устранение выбросов</i> »	10 %	10 %	10 %	15 %
Значения <i>Threshold/Порог</i>	0,03	0,03	0,03	0,03

Регистрация результатов амплификации по каналу Cy5/Red:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. Cy5»/«Cycling A. Red», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку «Linear scale»/«Линейная шкала», в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение «NTC threshold»/«Порог Фона» – ПФ (NTC) – 10 %.



6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку «Linear scale»/«Линейная шкала», в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу ROX/Orange:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. ROX»/«Cycling A. Orange», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку *Linear scale*/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение *NTC threshold*/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

Регистрация результатов амплификации по каналу JOE/Yellow:

1. Нажимают в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбирают режим анализа «Quantitation»/«Количественный», выбирают в меню «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», нажимают кнопку «Show»/«Показать».
2. Отменяют автоматический выбор «Threshold»/«Порог».
3. В меню основного окна «Quantitation analysis»/«Количественный анализ» активируют кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона».
4. Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажимают кнопку *Linear scale*/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки «Linear scale»/«Линейная шкала» видна кнопка «Log scale»/«Лог.шкала»).
5. В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» устанавливают значение *NTC threshold*/Порог Фона – ПФ (NTC) – 15 %.
6. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» (в правой части окна) выставляют «Threshold»/«Порог» = 0,03.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения порогового цикла (Ct).

7.4.4 Учет результатов

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Вносят значения Ct, полученные по каждому из каналов в бланк, и проводят учет и интерпретацию результатов в соответствии с таблицей учета результатов амплификации положительных (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4) и отрицательных контролей (ОКО выделения и ОКО ОТ-ПЦР) и таблицы интерпретации данных анализа с использованием на приборах типа «Rotor-Gene».

К учету результатов исследуемых проб приступают только в случае прохождения положительных (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4) и отрицательных (ОКО выделения и ОКО ОТ-ПЦР) контролей амплификации (Таблица 7).

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро- ли	Контро- лируе- мый этап исследо- вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/ Red</i>	<i>FAM/ Green</i>	<i>ROX/ Orange</i>	<i>JOE/ Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе- ния	Экстрак- ция нуклеи- нового материа- ла	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена

Принцип интерпритации результатов исследуемых проб представлен в таблице 8.

Таблица 8

Интерпретация данных анализа					
Пробы	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
	<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
	детекция ВКО	детекция WNV генотип-1	детекция WNV генотип-2	детекция WNV генотип-4	
Исследуемые пробы	определено или отсутствует	$Ct < 35$	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК WNV 1 генотипа обнаружена ; РНК/кДНК WNV 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК WNV 4 генотипа не обнаружена
	определено или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct < 33$	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК WNV 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК WNV 2 генотипа обнаружена ; РНК/кДНК WNV 4 генотипа не обнаружена
	определено или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct < 33$	РНК/кДНК WNV 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК WNV 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК WNV 4 генотипа обнаружена
	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК WNV 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК WNV 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК WNV 4 генотипа не обнаружена
	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	Результат невалидный; необходимо повторить исследование

РНК/кДНК WNV 1 генотипа обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу *FAM/Green* определено значение порогового цикла $Ct < 35$, по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange* значения Ct отсутствуют или $Ct > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла Ct .

РНК/кДНК WNV 2 генотипа обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу *ROX/Orange* определено значение порогового цикла $Ct < 33$, по каналу *FAM/Green* значение Ct отсутствует или $Ct > 35$, по каналу *JOE/Yellow* – значение Ct отсутствует или $Ct > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла Ct .

РНК/кДНК WNV 4 генотипа обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу *JOE/Yellow* определено значение порогового цикла $Ct < 33$, по каналу *FAM/Green* значение Ct отсутствует или $Ct > 35$, по каналу *ROX/Orange* значение Ct отсутствует или $Ct > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено или отсутствует значение порогового цикла Ct .

РНК/кДНК WNV 1, 2, 4 генотипов не обнаружена если для данной пробы в таблице результатов по каналу *FAM/Green* не определено значение (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или $Ct > 35$, по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange* не определены значения (кривые флуоресценции не пересекают пороговую линию) или $Ct > 33$, по каналу *Cy5/Red* определено значение Ct , не превышающее 33.

Пробы, для которых по каналу *FAM/Green* отсутствует или определено значение порогового цикла $Ct > 35$, по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange*, *Cy5/Red* отсутствуют или определены значения порогового цикла $Ct > 33$, результат анализа считают невалидным, требуется повторное проведение ОТ-ПЦР.

При повторном получении значения Ct более 35 по каналу *FAM/Green* и более 33 по каналам *JOE/Yellow*, *ROX/Orange*, *Cy5/Red* требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1 Условия хранения набора

Условия хранения компонентов набора реагентов ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3, Ревертаза *MMiv*, *Taq-F*-ДНК-полимераза, ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4, ВКО, ОКО выделения, ОКО ОТ-ПЦР – при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО хранить в защищенном от света месте.

8.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» осуществляют всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями и правилами, установленными для каждого вида транспорта. Условия транспортирования – при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °С – неограниченно.

8.3 Срок годности и условия эксплуатации набора

Срок годности набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» – 9 месяцев при соблюдении условий хранения. Условия эксплуатации набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» – при температуре от 18 до 25 °С.

8.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, 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 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

Наборы с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы относятся к отходам класса Б и подлежат утилизации в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

Упаковки набора реагентов после использования по назначению, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

9. ГАРАНТИИ И ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель гарантирует качество набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации в течение указанного срока годности.

Производитель - Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) (400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел. (8442) 37-37-74).

Зав. ОБТК, в.н.с.

ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора

Е.В. Прохвятилова

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор
ООО «Вымпел-Медцентр»



П.К. Варнавичус

Прошито и пронумеровано

увольнения / 27 листов(а)

Нач. отд. делопроизводства
Чернова Е.А.
Подпись *Е.А. Чернова*



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 27 ЛИСТОВ

« 11 » марта 2022 год

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

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Волгоградский

научно-исследовательский

противовирусный

институт Роспотребнадзора

Гопорков А.В.

2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению стандартного образца предприятия кДНК
вируса Западного Нила (*West Nile virus*) 2 генотипа «СОП кДНК *WNV-2*»
для проверки соответствия набора реагентов
«Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4»
техническим условиям

1. Общие указания

- 1.1. Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия кДНК вируса Западного Нила (*West Nile virus*) 2 генотипа «СОП кДНК *WNV-2*» для проверки соответствия набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» техническим условиям.

2. Подготовка к применению

- 2.1. Все работы с СОП кДНК *WNV-2* должны проводиться на аттестованном и поверенном оборудовании.
- 2.2. СОП кДНК *WNV-2* применяют для контроля изготовления отдельных компонентов и готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии.

3. Условия и порядок применения

- 3.1. Перед применением пробирку с СОП кДНК *WNV-2* достают из морозильной камеры и полностью размораживают при комнатной температуре. Пробирку перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5 с., центрифугируют при 2000-2500 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок.
- 3.2. Содержимое пробирки с СОП кДНК *WNV-2* делят на 2 аликвоты по 100 мкл.
- 3.3. Одну аликвоту непосредственно используют для выделения кДНК. Для второй аликвоты проводят десятикратные разведения в ТЕ-буфере до концентраций 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 ГЭ/мл. Для этого в 3 микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл вносят по 900 мкл ТЕ-буфера. В первую пробирку добавляют 100 мкл исходного препарата СОП кДНК *WNV-2*, перемешивают на микроцентрифуге/ встряхивателе и переносят 100 мкл в следующую пробирку с ТЕ-буфером и так далее до конечной концентрации 1×10^3 ГЭ/мл.
- 3.4. Из полученных разведений отбирают по 100 мкл и переносят в 3 чистые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.
- 3.5. Проводят выделение кДНК из 100 мкл исходного препарата СОП кДНК *WNV-2* и его разведений в соответствии с инструкцией к набору реагентов «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. На этапе выделения кДНК добавляют 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) в лизирующий раствор.

- 3.6. Дополнительно на этапе экстракции кДНК готовят отрицательный контроль выделения. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ОКО и 10 мкл ВКО.
- 3.7. Постановку ОТ-ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией к набору реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». При проведении ОТ-ПЦР с каждой ОТ-ПЦР-смесью-1 используют следующий набор образцов и контролей (Таблица 1).

Таблица 1

№ п/п	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО
1	ОКО выделения	ОКО выделения	ОКО выделения
2	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР
3	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4
4	СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ³ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ³ ГЭ/мл
5		СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ⁴ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ⁴ ГЭ/мл
6		СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ⁵ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ⁵ ГЭ/мл
7			СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10 ⁶ ГЭ/мл

- 3.8. Исследование препаратов кДНК, выделенных из СОП кДНК *WNV*-2, проводят трехкратно.

4. Оценка результатов

- 4.1. При контроле отдельных компонентов или готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии и использовании СОП кДНК *WNV*-2 результаты анализа должны соответствовать указанным в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро- ли	Контро лируе мый этап исследо вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/</i> <i>Red</i>	<i>FAM/</i> <i>Green</i>	<i>ROX/</i> <i>Orange</i>	<i>JOE/</i> <i>Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе ния	Экстрак ция нуклеи но вого материа ла	<i>Ct</i> < 33	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа

						не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена

Таблица 3

Интерпретация данных при тестировании СОП кДНК *WNV*-2

Пробы	Подтверждаемая характеристика	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10^3 ГЭ/мл	чувствительность	$Ct < 33$	не учитывают	$Ct > 33$ или отсутствует	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена
		или				
		определено или отсутствует	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10^4 ГЭ/мл	чувствительность	определено или отсутствует	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10^5 ГЭ/мл	чувствительность	определено или отсутствует	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -2 1×10^6 ГЭ/мл	специфичность	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	не учитывают	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена

- 4.2. Воспроизводимость анализа должна соответствовать 100 %. При получении результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1 анализ повторяют. Если при повторном исследовании получают аналогичные результаты, для анализа используют другие пробирки с СОП кДНК *WNV*-2. В случае получения результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1. при исследовании второй пробирки СОП кДНК *WNV*-2, готовый набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» бракуют и проводят повторную подготовку компонентов набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».
5. Условия хранения
- 5.1. СОП кДНК *WNV*-2 хранится при температуре от минус 18 до минус 20 °С.
- 5.2. Допускается хранение размороженных пробирок СОП кДНК *WNV*-2 при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 ч.

Зав. ОБТК



Е.В. Прохвятилова

Прошито и пронумеровано

4 (четыре) листов (а)

Зав. отд. делопроизводства
Чернова Е.А.

Чернова Е.А.
Подпись

Подпись



УТВЕРЖДАЮ



Директор ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противочумный
институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению стандартного образца предприятия кДНК
вируса Западного Нила (*West Nile virus*) 4 генотипа «СОП кДНК *WNV*-4»
для проверки соответствия набора реагентов
«Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4»
техническим условиям

1. Общие указания

- 1.1. Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия кДНК вируса Западного Нила (*West Nile virus*) 4 генотипа «СОП кДНК *WNV*-4» для проверки соответствия набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» техническим условиям.

2. Подготовка к применению

- 2.1. Все работы с СОП кДНК *WNV*-4 должны проводиться на аттестованном и поверенном оборудовании.
- 2.2. СОП кДНК *WNV*-4 применяют для контроля изготовления отдельных компонентов и готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии.

3. Условия и порядок применения

- 3.1. Перед применением пробирку с СОП кДНК *WNV*-4 достают из морозильной камеры и полностью размораживают при комнатной температуре. Пробирку перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5 с., центрифугируют при 2000-2500 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок.
- 3.2. Содержимое пробирки с СОП кДНК *WNV*-4 делят на 2 аликвоты по 100 мкл.
- 3.3. Одну аликвоту непосредственно используют для выделения кДНК. Для второй аликвоты проводят десятикратные разведения в ТЕ-буфере до концентраций 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 ГЭ/мл. Для этого в 3 микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл вносят по 900 мкл ТЕ-буфера. В первую пробирку добавляют 100 мкл исходного препарата СОП кДНК *WNV*-4, перемешивают на микроцентрифуге/ встряхивателе и переносят 100 мкл в следующую пробирку с ТЕ-буфером и так далее до конечной концентрации 1×10^3 ГЭ/мл.
- 3.4. Из полученных разведений отбирают по 100 мкл и переносят в 3 чистые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.
- 3.5. Проводят выделение кДНК из 100 мкл исходного препарата СОП кДНК *WNV*-4 и его разведений в соответствии с инструкцией к набору реагентов «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. На этапе выделения кДНК добавляют 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) в лизирующий раствор.

- 3.6. Дополнительно на этапе экстракции кДНК готовят отрицательный контроль выделения. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ОКО и 10 мкл ВКО.
- 3.7. Постановку ОТ-ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией к набору реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». При проведении ОТ-ПЦР с каждой ОТ-ПЦР-смесью-1 используют следующий набор образцов и контролей (Таблица 1).

Таблица 1

№ п/п	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО
1	ОКО выделения	ОКО выделения	ОКО выделения
2	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР
3	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4
4	СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10 ³ ГЭ/мл
5			СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10 ⁴ ГЭ/мл
6			СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10 ⁵ ГЭ/мл
7			СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10 ⁶ ГЭ/мл

- 3.8. Исследование препаратов кДНК, выделенных из СОП кДНК *WNV*-4, проводят трехкратно.

4. Оценка результатов

- 4.1. При контроле отдельных компонентов или готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии и использовании СОП кДНК *WNV*-4 результаты анализа должны соответствовать указанным в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро- ли	Контро- лируе- мый этап исследо- вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/</i> <i>Red</i>	<i>FAM/</i> <i>Green</i>	<i>ROX/</i> <i>Orange</i>	<i>JOE/</i> <i>Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе- ния	Экстрак- ция нуклеи- но вого материа- ла	<i>Ct</i> < 33	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа

						не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена

Таблица 3

Интерпретация данных при тестировании СОП кДНК *WNV*-4

Пробы	Подтверждаемая характеристика	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10^3 ГЭ/мл	чувствительность	$Ct < 33$	не учитывают	не учитывают	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
		или				
		определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10^4 ГЭ/мл	чувствительность	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10^5 ГЭ/мл	чувствительность	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -4 1×10^6 ГЭ/мл	специфичность	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена

- 4.2. Воспроизводимость анализа должна соответствовать 100 %. При получении результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1 анализ повторяют. Если при повторном исследовании получают аналогичные результаты, для анализа используют другие пробирки с СОП кДНК *WNV*-4. В случае получения результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1. при исследовании второй пробирки СОП кДНК *WNV*-4, готовый набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» бракуют и проводят повторную подготовку компонентов набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».
5. Условия хранения
- 5.1. СОП кДНК *WNV*-4 хранится при температуре от минус 18 до минус 20 °С.
- 5.2. Допускается хранение размороженных пробирок СОП кДНК *WNV*-4 при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 ч.

Зав. ОБТК



Е.В. Прохвятилова

Прошито и пронумеровано

4 (четыре) листов(а)

Зав. отд. делопроизводства

Чернова Е.А.

Подпись





ИНСТРУКЦИЯ
по применению стандартного образца предприятия кДНК
вируса Западного Нила (*West Nile virus*) 1 генотипа «СОП кДНК *WNV*-1»
для проверки соответствия набора реагентов
«Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4»
техническим условиям

1. Общие указания

- 1.1. Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия кДНК вируса Западного Нила (*West Nile virus*) 1 генотипа «СОП кДНК *WNV*-1» для проверки соответствия набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» техническим условиям.

2. Подготовка к применению

- 2.1. Все работы с СОП кДНК *WNV*-1 должны проводиться на аттестованном и поверенном оборудовании.
- 2.2. СОП кДНК *WNV*-1 применяют для контроля изготовления отдельных компонентов и готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии.

3. Условия и порядок применения

- 3.1. Перед применением пробирку с СОП кДНК *WNV*-1 достают из морозильной камеры и полностью размораживают при комнатной температуре. Пробирку перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5 с., центрифугируют при 2000-2500 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок.
- 3.2. Содержимое пробирки с СОП кДНК *WNV*-1 делят на 2 аликвоты по 100 мкл.
- 3.3. Одну аликвоту непосредственно используют для выделения кДНК. Для второй аликвоты проводят десятикратные разведения в ТЕ-буфере до концентраций 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 ГЭ/мл. Для этого в 3 микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл вносят по 900 мкл ТЕ-буфера. В первую пробирку добавляют 100 мкл исходного препарата СОП кДНК *WNV*-1, перемешивают на микроцентрифуге/ встряхивателе и переносят 100 мкл в следующую пробирку с ТЕ-буфером и так далее до конечной концентрации 1×10^3 ГЭ/мл.
- 3.4. Из полученных разведений отбирают по 100 мкл и переносят в 3 чистые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.
- 3.5. Проводят выделение кДНК из 100 мкл исходного препарата СОП кДНК *WNV*-1 и его разведений в соответствии с инструкцией к набору реагентов «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. На этапе выделения кДНК добавляют 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) в лизирующий раствор.

- 3.6. Дополнительно на этапе экстракции кДНК готовят отрицательный контроль выделения. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ОКО и 10 мкл ВКО.
- 3.7. Постановку ОТ-ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией к набору реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». При проведении ОТ-ПЦР с каждой ОТ-ПЦР-смесью-1 используют следующий набор образцов и контролей (Таблица 1).

Таблица 1

№ п/п	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО
1	ОКО выделения	ОКО выделения	ОКО выделения
2	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР
3	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4
4	СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ³ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ³ ГЭ/мл
5	СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ⁴ ГЭ/мл		СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ⁴ ГЭ/мл
6	СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ⁵ ГЭ/мл		СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ⁵ ГЭ/мл
7			СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10 ⁶ ГЭ/мл

- 3.8. Исследование препаратов кДНК, выделенных из СОП кДНК *WNV*-1, проводят трехкратно.

4. Оценка результатов

- 4.1. При контроле отдельных компонентов или готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии и использовании СОП кДНК *WNV*-1 результаты анализа должны соответствовать указанным в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро-ли	Контро-лируе-мый этап исследо-вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе-ния	Экстрак-ция нуклеи-ного материа-ла	<i>Ct</i> < 33	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа

						не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена

Таблица 3

Интерпретация данных при тестировании СОП кДНК *WNV*-1

Пробы	Подтверждаемая характеристика	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10^3 ГЭ/мл	чувствительность	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена
		или				РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10^4 ГЭ/мл	чувствительность	определено или отсутствует	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10^5 ГЭ/мл	чувствительность	определено или отсутствует	$Ct < 35$	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
СОП кДНК <i>WNV</i> -1 1×10^6 ГЭ/мл	специфичность	$Ct < 33$	не учитывают	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена

4.2. Воспроизводимость анализа должна соответствовать 100 %. При получении результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1 анализ повторяют. Если при повторном исследовании получают аналогичные результаты, для анализа используют другие пробирки с СОП кДНК *WNV*-1. В случае получения результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1. при исследовании второй пробирки СОП кДНК *WNV*-1, готовый набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» бракуют и проводят повторную подготовку компонентов набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».

5. Условия хранения

- 5.1. СОП кДНК *WNV*-1 хранится при температуре от минус 18 до минус 20 °С.
- 5.2. Допускается хранение размороженных пробирок СОП кДНК *WNV*-1 при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 ч.

Зав. ОБТК



Е.В. Прохвятилова

Прошито и пронумеровано
4/456789 листов(а)
Зав. отд. д. доп. производства
Чернова Е.А.
Подпись А.В. Чернова
МП



УТВЕРЖДАЮ



директор ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противовирусный
институт Роспотребнадзора
Топорков А.В.
12 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению стандартного образца предприятия кДНК
вируса краснухи (*Rubella virus*) «СОП кДНК RUBV»
для проверки соответствия набора реагентов
«Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4»
техническим условиям

1. Общие указания

- 1.1. Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*) «СОП кДНК RUBV» для проверки соответствия набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» техническим условиям.

2. Подготовка к применению

- 2.1. Все работы с СОП кДНК RUBV должны проводиться на аттестованном и поверенном оборудовании.
- 2.2. СОП кДНК RUBV применяют для контроля изготовления отдельных компонентов и готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии.

3. Условия и порядок применения

- 3.1. Перед применением пробирку с СОП кДНК RUBV достают из морозильной камеры и полностью размораживают при комнатной температуре. Пробирку перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе в течение 5 с., центрифугируют при 2000-2500 об/мин в течение 5-10 с для осаждения капель со стенок.
- 3.2. Отбирают 100 мкл препарата СОП кДНК RUBV и переносят в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.
- 3.3. Проводят выделение кДНК из 100 мкл препарата СОП кДНК RUBV в соответствии с инструкцией к набору реагентов «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичных. На этапе выделения кДНК добавляют 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) в лизирующий раствор.
- 3.4. Дополнительно на этапе экстракции кДНК готовят отрицательный контроль выделения. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносят 100 мкл ОКО и 10 мкл ВКО.
- 3.5. Постановку ОТ-ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией к набору реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». При проведении ОТ-ПЦР с каждой ОТ-ПЦР-смесью-1 используют следующий набор образцов и контролей (Таблица 1).

Таблица 1

№ п/п	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО
1	ОКО выделения	ОКО выделения	ОКО выделения
2	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР
3	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4
4	СОП кДНК <i>RUBV</i> 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>RUBV</i> 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>RUBV</i> 1×10 ⁶ ГЭ/мл

3.6. Исследование препаратов кДНК, выделенных из СОП кДНК *RUBV*, проводят трехкратно.

4. Оценка результатов

4.1. При контроле отдельных компонентов или готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии и использовании СОП кДНК *RUBV* результаты анализа должны соответствовать указанным в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро- ли	Контро- лируе- мый этап исследо- вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/</i> <i>Red</i>	<i>FAM/</i> <i>Green</i>	<i>ROX/</i> <i>Orange</i>	<i>JOE/</i> <i>Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе- ния	Экстрак- ция нуклеи- но вого материа- ла	<i>Ct</i> < 33	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> < 35	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	<i>Ct</i> < 33	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена

ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена
--	--------	----------------------------------	-----------------	-----------------	-----------	---

Таблица 3

Интерпретация данных при тестировании СОП кДНК *RUBV*

Пробы	Подтверждаемая характеристика	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
СОП кДНК <i>RUBV</i> 1×10^6 ГЭ/мл	специфичность	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена

4.2. Воспроизводимость анализа должна соответствовать 100 %. При получении результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1 анализ повторяют. Если при повторном исследовании получают аналогичные результаты, для анализа используют другие пробирки с СОП кДНК *RUBV*. В случае получения результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1. при исследовании второй пробирки СОП кДНК *RUBV*, готовый набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» бракуют и проводят повторную подготовку компонентов набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».

5. Условия хранения

- 5.1. СОП кДНК *RUBV* хранится при температуре от минус 18 до минус 20 °С.
- 5.2. Допускается хранение размороженных пробирок СОП кДНК *RUBV* при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 ч.

Зав. ОБТК



Е.В. Прохвятилова

Прошито и пронумеровано

3/три листов(а)

Зав. отд. делопроизводства

Чернова Е.А.

Подпись

М П





УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противочумный
институт Роспотребнадзора

Топорков А.В.

25.03.2021 г.

СВИДЕТЕЛЬСТВО

на стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки
(*Yellow fever virus*) «СОП кДНК YFV»

Серия: 4/21

Назначение: стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*) «СОП кДНК YFV» предназначен для проверки соответствия «Набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019» при изготовлении серии препарата и проведении предусмотренных ТУ испытаний.

Аттестуемая характеристика: отсутствие специфической флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange аналогично, как при исследовании препаратов РНК, выделенных из культур клеток, инфицированных *Yellow fever virus* с концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл.

Дополнительные сведения: СОП кДНК YFV представляет собой микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, содержащую 0,1 мл раствора кДНК *Yellow fever virus*, полученной из аттенуированного штамма *Yellow fever virus* 17D (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия), с концентраций 1×10^6 ГЭ/мл.

Количество наборов - 10 шт.

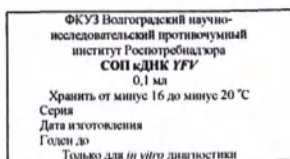
Документ, определяющий порядок и условия применения СОП: Инструкция по применению СОП кДНК YFV для проверки соответствия набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» техническим условиям.

Условия хранения: СОП кДНК YFV должен храниться при температуре от минус 18° до минус 20° °C.

Срок действия: 1 год

Дата выпуска: 25.03.2021 г.

Маркировка пробирок:



Зав. ОБТК, в.н.с.

Е.В. Прохвятилова

Директор ФКУЗ Волгоградский
научно-исследовательский
противочумный
институт Роспотребнадзора

2019 г.



по применению стандартного образца предприятия кДНК
вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*) «СОП кДНК *YFV*»
для проверки соответствия набора реагентов
«Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4»
техническим условиям

3.5. Постановку ОТ-ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией к набору реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». При проведении ОТ-ПЦР с каждой ОТ-ПЦР-смесью-1 используют следующий набор образцов и контролей (Таблица 1).

Таблица 1

№ п/п	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР-смесь-1 <i>WNV</i> генотип-4/ВКО
1	ОКО выделения	ОКО выделения	ОКО выделения
2	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР	ОКО ОТ-ПЦР
3	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4
4	СОП кДНК <i>YFV</i> 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>YFV</i> 1×10 ⁶ ГЭ/мл	СОП кДНК <i>YFV</i> 1×10 ⁶ ГЭ/мл

3.6. Исследование препаратов кДНК, выделенных из СОП кДНК *YFV*, проводят трехкратно.

4. Оценка результатов

4.1. При контроле отдельных компонентов или готового препарата «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» новой серии и использовании СОП кДНК *YFV* результаты анализа должны соответствовать указанным в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Интерпретация данных при тестировании контрольных образцов

Контро- ли	Контро- лируе- мый этап исследо- вания	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/</i> <i>Red</i>	<i>FAM/</i> <i>Green</i>	<i>ROX/</i> <i>Orange</i>	<i>JOE/</i> <i>Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
ОКО выделе- ния	Экстрак- ция нуклеи- но вого материа- ла	<i>Ct</i> < 33	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ОКО ОТ-ПЦР	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> > 35 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	<i>Ct</i> > 33 или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-1	ОТ-ПЦР	не учитывают	<i>Ct</i> < 35	не учитывают	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа обнаружена
ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-2	ОТ-ПЦР	не учитывают	не учитывают	<i>Ct</i> < 33	не учитывают	РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа обнаружена

ПКО кДНК <i>WNV</i> генотип-4	ОТ-ПЦР	определено или отсутствует	не учитывают	не учитывают	$Ct < 33$	РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа обнаружена
--	--------	----------------------------------	-----------------	-----------------	-----------	---

Таблица 3

Интерпретация данных при тестировании СОП кДНК *YFV*

Пробы	Подтверждаемая характеристика	Значение порогового цикла (Ct) по каналу				Результат
		<i>Cy5/Red</i>	<i>FAM/Green</i>	<i>ROX/Orange</i>	<i>JOE/Yellow</i>	
		детекция ВКО	детекция <i>WNV</i> генотип-1	детекция <i>WNV</i> генотип-2	детекция <i>WNV</i> генотип-4	
СОП кДНК <i>YFV</i> 1×10^6 ГЭ/мл	специфичность	$Ct < 33$	$Ct > 35$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	$Ct > 33$ или отсутствует	РНК/кДНК <i>WNV</i> 1 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 2 генотипа не обнаружена; РНК/кДНК <i>WNV</i> 4 генотипа не обнаружена

4.2. Воспроизводимость анализа должна соответствовать 100 %. При получении результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1 анализ повторяют. Если при повторном исследовании получают аналогичные результаты, для анализа используют другие пробирки с СОП кДНК *YFV*. В случае получения результатов, не соответствующих таковым по пункту 4.1. при исследовании второй пробирки СОП кДНК *YFV*, готовый набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» бракуют и проводят повторную подготовку компонентов набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».

5. Условия хранения

- 5.1. СОП кДНК *YFV* хранится при температуре от минус 18 до минус 20 °С.
- 5.2. Допускается хранение размороженных пробирок СОП кДНК *YFV* при температуре от 2 до 8 °С в течение 48 ч.

Зав. ОБТК



Е.В. Прохвятилова

Прошито и пронумеровано

3 (три) листов(а)

Зав. отделением производства
Чернова Е.А.
Подпись _____

М.П.

