



646-2 2024-04-22



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления нуклеиновых кислот возбудителей
острых респираторных вирусных инфекций человека
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ОРВИ Комплекс

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2022/17008 от 26 апреля 2022 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	13
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	14
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	16
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	21
9	УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	21
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	25
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	26
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	26
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	26
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	26
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	27
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	28
	Приложение А.....	30

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV	- Severe acute respiratory syndrome coronavirus (коронавирус, вызывающий острый респираторный синдром)
SARS-CoV-2	- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус, вызывающий острый респираторный синдром 2), эквивалентные названия COVID-19 virus, 2019-nCoV, Wuhan seafood market pneumonia virus
COVID-19	- COrona VIrus Disease 2019, коронавирусное заболевание 2019
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
ИБ	- интерферирующие вещества
НК	- нуклеиновые кислоты
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ВК	- внутренний контроль
К-	- отрицательный контрольный образец

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1** Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОРВИ Комплекс), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Назначение: Набор реагентов предназначен для выявления и дифференциации нуклеиновых кислот возбудителей эпидемических и сезонных острых респираторных вирусных инфекций человека (коронавирус SARS-CoV-2, вирусы гриппа А и В, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа 1-4 типов, риновирус, аденовирус, метапневмовирус, коронавирусы HKU1, NL63, OC43, 229E, бокавирус) в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- 1.3** Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.
- 1.4** Показания к проведению исследования:
- наличие симптомов и контакт с больными ОРВИ;
 - пребывание в очагах инфекции (с целью раннего выявления возможного инфицирования и предотвращения дальнейшего распространения);
 - дифференциальная диагностика ОРВИ.
- Противопоказаний к применению нет.
- 1.5** Демографические и популяционные аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.
- 1.6** Область применения: Набор реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений, безопасность работы лабораторий должна быть обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.
- 1.7** Потенциальные пользователи: квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 1.8** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R3-P439-S3/5			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки	по 1,0 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	100 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	250 мкл
Буфер для растворения	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	320 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 24 определения, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: обратная транскрипция (ОТ) РНК с последующей амплификацией фрагментов кДНК (для РНК-содержащих вирусов) или ДНК (для ДНК-содержащих вирусов) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК/ДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК/ДНК проводят в одной пробирке, что повышает чувствительность метода, уменьшает вероятность контаминации и снижает время проведения исследования.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина или использования Taq-полимеразы, блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав набора реагентов включен внутренний контрольный образец РНК-ВК "А", который предназначен для оценки этапа выделения нуклеиновых кислот (НК) и качества прохождения ОТ-ПЦР.

В реакционные смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой кДНК/ДНК возбудителей ОРВИ, включена флуоресцентная метка Fam, Rox или Cy5.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта внутреннего контрольного образца РНК-ВК "А", включена флуоресцентная метка Hex.

В смесь для амплификации пробирки № 3 набора добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором для определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После окончания программы программное обеспечение проводит сравнение заданного оператором расположения стрипов с реальным положением маркера Rox, и, если находит несовпадение (при неправильном расположении стрипов), то предупреждает об этом оператора.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке, одновременно.

Перечень показателей, определяемых набором реагентов, приведен в таблице 1.

Исследование с использованием набора реагентов ОРВИ Комплекс состоит из следующих этапов: выделение нуклеиновых кислот (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК/ДНК с одновременной детекцией результатов.

Реагенты для выделения нуклеиновых кислот не включены в состав набора реагентов. Выделение нуклеиновых кислот проводят с использованием наборов, зарегистрированных в установленном порядке в Российской Федерации.

Таблица 1 – Выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

Номер пробирки в стрипе	Выявляемый показатель, каналы детекции				Цветовая маркировка смеси
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	Influenza A virus	PHK-BK ¹	Коронавирус SARS-CoV-2, гены E, N	Influenza B virus	Голубая
2	Human parainfluenza virus type 2	PHK-BK	Human parainfluenza virus type 4	Human coronavirus 229E	Бесцветная
3	Human bocavirus	PHK-BK	Маркер	Human rhinovirus	
4	Human respiratory syncytial virus	PHK-BK	–	Human coronavirus HKU1	
5	Human adenovirus	PHK-BK	–	Human coronavirus NL63	
6	Human coronavirus OC43	PHK-BK	–	Human parainfluenza virus type 3	
7	Human parainfluenza virus type 1	PHK-BK	–	–	
8	Human metapneumovirus	PHK-BK	–	–	
¹ – «PHK-BK» в тесте ОРВИ Комплекс обозначен как «BK»					

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих нуклеиновые кислоты выявляемых вирусов – положительный результат амплификации (регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции) фрагментов геномов специфичных продуктов по соответствующим каналам детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих нуклеиновые кислоты выявляемых вирусов - отрицательный результат амплификации (отсутствует экспоненциальный рост уровня флуоресценции) фрагментов геномов специфичных продуктов по соответствующим каналам детекции и положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца по каналу детекции Hex.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце нуклеиновых кислот типичных представителей *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Candida spp.*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterovirus*, HSV 1, 2, а также ДНК человека в концентрации более 750 нг на амплификационную пробирку.

Выявлены специфические результаты амплификации при наличии в образце НК выявляемых аналитов: коронавирус SARS-CoV-2 (исследуемых в рамках международной системы QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания), вирус гриппа В, вирус гриппа А разных субтипов (включая (H1N1)pdm09, H3N2), респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа 1-4 типов, риновирус, аденовирус, метапневмовирус, коронавирусы HKU1, NL63, OC43, 229E, бокавирус.

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций каждой из систем, входящей в состав набора реагентов по отношению к возбудителям, определяемым другими системами.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфических продуктов.

К интерферирующим веществам, ингибирующим ПЦР, отнесены:

- эндогенные вещества (цельная кровь; лейкоциты; слизь);
- экзогенные (вещества, добавляемые в образцы биоматериала во время пробоподготовки (изопропиловый спирт и метилацетат); местные лекарственные препараты).

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на проведение амплификации составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца НК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца НК, метилацетат – 100 мкл/мл образца НК.

Интерферирующее влияние таких веществ, как лейкоциты, слизь, местные лекарственные препараты, которые могут содержаться в образцах биоматериала в клинически значимых концентрациях, не наблюдалось.

Для снижения количества интерферирующих веществ, ингибирующих ПЦР, необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения нуклеиновых кислот, позволяющие произвести их максимальное удаление из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения нуклеиновых кислот.

3.3 Предел обнаружения

3.3.1 Предел обнаружения для показателей Influenza A virus, Influenza B virus, Коронавирус SARS-CoV-2, гены E, N: 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку и 20 копий - для остальных вирусов.

3.3.2 Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений двух серий лабораторного контрольного образца (ЛКО).

Предел обнаружения НК в образце биоматериала зависит от метода предобработки образца биоматериала.

Минимальное количество биоматериала, из которого могут быть выделены НК: 100 мкл.

Предел обнаружения 10 или 20 копий НК на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации НК в образце при использовании комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС» при конечном объеме препарата НК, равном 100 мкл.

Аналиты	Предел обнаружения	
	Influenza A virus, Influenza B virus, Коронавирус SARS-CoV-2	Human parainfluenza virus type 1-4, Human coronavirus 229E, OC43, HKU1, NL63, Human respiratory syncytial virus, Human metapneumovirus, Human rhinovirus, Human adenovirus, Human bocavirus
	10 копий / на амплификационную пробирку	20 копий / на амплификационную пробирку
	Объем полученного препарата НК - 100 мкл	
Биоматериал/комплект для выделения НК	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды;	2×10^3 коп/мл образца	4×10^3 коп/мл образца
Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	2×10^3 коп/мл образца	4×10^3 коп/мл образца
Мокрота (предобработка с Na_3PO_4)	4×10^3 коп/мл образца	8×10^3 коп/мл образца
Мокрота (предобработка с муколизинном)	1×10^4 коп/мл образца	2×10^4 коп/мл образца

3.4 Диагностические характеристики набора реагентов

При проведении клинико-лабораторных испытаний набора реагентов «ОРВИ Комплекс» получены следующие диагностические характеристики (диагностическая чувствительность и специфичность были рассчитаны по совокупности полученных истинных результатов среди всех 16 показателей, выявляемых набором реагентов):

Вид биоматериала	Количество образцов, шт.	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Мазок из носоглотки, ротоглотки	82	100% (95,32-100)	100% (99,70-100)
Бронхоальвеолярный лаваж	29	100% (87,23-100)	100% (99,16-100)
Эндотрахеальный аспират	18	100% (79,41-100)	100% (98,65-100)
Назофарингеальный аспират	21	100% (85,18-100)	100% (98,83-100)
Мокрота	76	100% (95,26-100)	100% (99,68-100)
Итого	226	100% (98,31-100)	100% (99,89-100)

3.5 Внутри- и межсерийная воспроизводимость набора реагентов

Оценка внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости набора реагентов проведена путём сравнения результатов, полученных при исследовании одних и тех же 25 образцов биоматериала.

Внутрисерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 92,45–100%).

Межсерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 92,45–100%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 обязаны обеспечивать безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия. Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

К работе с набором реагентов допускается специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Выделение НК следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы, используемые при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарно-эпидемиологическими правилами и нормы СанПиН 3.3686-21.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Опасный компонент	Указание на риски
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Нет опасных веществ	-
ОТ-ПЦР-буфер	Нет опасных веществ	-
Фермент Taq/RT	Нет опасных веществ	-
Буфер для растворения	Нет опасных веществ	-
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Азид натрия <0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец	Азид натрия <0,1%	Является безопасным для конечного пользователя

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификаторы детектирующие ДТлайт, ДТпрайм или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»);
- микроцентрифуга-вортекс;
- ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- холодильник с морозильной камерой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников и других расходных материалов.

Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения нуклеиновых кислот требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической (микробиологической) безопасности II-III класса;
- центрифуга для микропробирок, с RCF не ниже 16 000 x g;
- термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный, поддерживающий температуру 65 °С);
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- микроцентрифуга-вортекс;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 0,2-20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;

- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство;
- физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;
- транспортная среда;
- комплект для выделения НК из биологического материала (рекомендуется Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС), в комплектации ПРОБА-НК или ПРОБА-НК-ПЛЮС, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867.

Для предобработки мокроты Na_3PO_4 :

- 10% раствор трёхзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12\text{H}_2\text{O}$;
- 1М раствор HCl ;
- 5% раствор хлорамина;
- вода дистиллированная.

Для предобработки мокроты муколизин:

- муколизин.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки из носоглотки и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокроту.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09, СанПин 3.3686-21.

Ограничение метода:

– для образцов из носоглотки и ротоглотки: местное применение лекарственных препаратов (спреи, капли, кремы и мази) – менее чем за 24 часа до исследования. При использовании аэрозолей и других форм лекарственных препаратов для ингаляций при лечении бронхиальной астмы, материал для исследований следует брать не ранее чем через три часа после ингаляции или приёма пищи.

6.2 Общие требования

6.2.1 На этапах подготовки биоматериала и выделения из него нуклеиновых кислот используйте одноразовые наконечники, свободные от РНКаз и ДНКаз (с фильтром, за исключением этапа отбора надосадочной жидкости с использованием аспиратора).

6.2.2 Для предотвращения контаминации всегда открывайте крышку только той

пробирки, с которой идет работа, и закрывайте её после этого. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

6.2.3 При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

6.3 Взятие материала на исследование

6.3.1 Мазки из носоглотки

Мазки берут сухим стерильным зондом, для чего зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают к низу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением, прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.3.2 Мазки из ротоглотки

Мазки берут сухим стерильным зондом, вращательным движением с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки глотки.

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением, прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.3.3 Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота

Образцы собирают в стерильные пластиковые контейнеры. После взятия биологического материала перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл 1,0 мл образца. Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте её.

Примечание – Процедура предобработки мокроты раствором трёхзамещенного фосфорнокислого натрия (Na_3PO_4) или муколизином, приведена в инструкции к комплекту реагентов «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС)», в комплектации ПРОБА-НК или ПРОБА-НК-ПЛЮС, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867, раздел «Взятие и подготовка клинического материала» (Мокрота (способ 1 и способ 2)).

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

Транспортирование и хранение исследуемого материала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» от 30.04.2020.

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспортирование	Условия хранения до транспортирования	Комментарии
Мазок из носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков**	4 °C	≤5 дней: 4 °C >5 дней*: -70 °C	Носоглоточные и орофарингеальные тампоны должны быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер	4 °C	≤48 часов: 4 °C >48 часов*: -70 °C	Возможно небольшое разведение образца
Эндотрахеальный аспират, аспират носоглотки или смыв из носа	Стерильный контейнер	4 °C	≤48 часов: 4 °C >48 часов*: -70 °C	
Мокрота	Стерильный контейнер	4 °C	≤48 часов: 4 °C >48 часов*: -70 °C	Убедитесь, что материал поступает из нижних дыхательных путей
* - При невозможности обеспечить хранение при минус 70 °C, образцы хранить при минус 20 °C. ** - Для транспортировки образцов используют транспортную среду для хранения и транспортировки респираторных мазков или физиологический раствор (при условии транспортировки до лаборатории не более 24 часов после взятия образца) или сухой зонд-тампон (при условии транспортировки до лаборатории не более 4 часов после взятия образца).				

Примечание – рекомендуется использовать транспортные среды, содержащие консерванты, например, СТОР-Ф (производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640) или аналогичные, зарегистрированные в установленном порядке, предназначенные для дальнейшего исследования образцов методом ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! Диапазон вирусной нагрузки для различных возбудителей ОРВИ, в том числе для SARS-CoV-2 может варьировать в широких пределах. В связи с этим, при выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении нуклеиновых кислот. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации биоматериалом в лаборатории рекомендуется выполнение следующих правил:

1. Необходимо проводить визуальную оценку поступившего биоматериала и выбраковку всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.

2. По возможности выделять в отдельный поток образцы от пациентов из стационара с симптомами острой инфекции и анализировать их отдельно от остальных образцов (биоматериал для скрининга контактировавших лиц и пациентов с легким течением заболевания). Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательно выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.
3. Обязательно выполнять постановку отрицательных контрольных образцов, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот, в каждом протоколе.
4. Использовать на всех этапах исследования наконечники с аэрозольными фильтрами.
5. Четко соблюдать методику выполнения исследования, открывать пробирки типа Эппендорф при помощи пинцета (не допускать касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки); при внесении реагентов не касаться наконечником пробирки (если это произошло, сразу заменить наконечник).

7.1 Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения нуклеиновых кислот из мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата, мокроты используют комплекты для выделения нуклеиновых кислот, зарегистрированные в РФ в установленном порядке (см. Таблицу 2).

Выделение нуклеиновых кислот проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Объем полученного препарата нуклеиновых кислот должен составлять **100 мкл**. Дальнейшее увеличение объема полученного препарата нуклеиновых кислот приводит к пропорциональному снижению концентрации НК и уменьшению чувствительности анализа.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат нуклеиновых кислот необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Допускается однократное замораживание и хранение препарата нуклеиновых кислот при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток.

Таблица 2 - Наборы реагентов, валидированные для выделения нуклеиновых кислот для дальнейшего исследования набором реагентов ОРВИ Комплекс

Набор реагентов, РУ	Комплектация	Биоматериал
Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота
	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС (укороченная методика в соответствии с Приложением А)	Мазки из носоглотки, ротоглотки

7.1.1 Особенности предобработки биоматериала для последующего исследования с применением набора реагентов ОРВИ Комплекс

ВНИМАНИЕ! В ходе подготовки мазков из носоглотки и зева (ротоглотки), взятых в пробирку с транспортной средой, образцов бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата предварительное центрифугирование не требуется.

Для выделения используется **100 мкл образца**.

Примечание - Объем полученного препарата нуклеиновых кислот должен быть 100 мкл, при меньшем количестве следует перед проведением ОТ-ПЦР довести объем до необходимого, используя буфер для растворения из набора ОРВИ Комплекс.

7.1.2 Использование контрольных образцов на этапе выделения нуклеиновых кислот

Внутренний контрольный образец

Для исключения ложноотрицательных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно добавление **внутреннего контрольного образца** в биологические образцы на этапе выделения нуклеиновых кислот.

При проведении пробоподготовки в качестве внутреннего контрольного образца необходимо использовать **внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" из набора реагентов ОРВИ Комплекс**.

РНК-ВК "А" следует использовать **в объеме 10 мкл на образец**.

Отрицательный контрольный образец

Для исключения ложноположительных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно использование **отрицательного контрольного образца** с этапа выделения нуклеиновых кислот.

На этапе выделения нуклеиновых кислот обязательно использовать **отрицательный контрольный образец**, который необходимо провести через все этапы выделения одновременно с выделением нуклеиновых кислот из биологических образцов.

В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор в объеме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения нуклеиновых кислот, или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего комплекта реагентов.

7.2 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одному стрипу со смесями для амплификации, запечатанными парафином, для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (K+) и отрицательного контрольного образца (K-).

Примечание – Один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 стрипов для исследуемых образцов; один стрип для «К+» и один стрип для «К-». Общее количество стрипов – 8.

7.2.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 15 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество пробирок в промаркированных стрипах с учетом «К+» и «К-».

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Промаркированных стрипов (по 8 пробирок) – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT для 65 (64+1) пробирок, т.е. 975 мкл ОТ-ПЦР-буфера + 32,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.2.4 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирки с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.

7.2.6 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением НК открывать крышки только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты НК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром. Закрывайте стрипы плотно.

7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина, в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 10 мкл полученного из образцов препарата НК.

7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирки стрипа, промаркированного «К+», по 10 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирки стрипа, промаркированного «К-», по 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК.

7.2.10 Центрифугируйте стрипы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.11 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл с параметрами теста «ОРВИ Комплекс». При последующих постановках укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (объем реакционной смеси 40 мкл) и проведите ОТ-ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 3.

Примечание - Продукты амплификации можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца или при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение 12 месяцев.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	35	20	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	94	0	10	5		Цикл
	64	0	10		√	
4	94	0	5	45		Цикл
	64	0	10		√	
5	80	0	1	1		Цикл
6	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

¹ - допускается хранение при температуре 25 °С

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов (Таблица 4).

Т а б л и ц а 4 – Интерпретация результатов исследования контрольных образцов

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox	Cy5	
Положительный контрольный образец				
Ср указан (в пробирках № 1-8)	Ср не учитывается	Ср указан (в пробирках № 1-2)	Ср указан (в пробирках № 1-6)	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец				
Ср не указан	Ср указан	Ср не указан	Ср не указан	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

9.2 В биологических образцах, содержащих нуклеиновые кислоты одного или нескольких выявляемых набором реагентов вирусов, должны быть зафиксированы положительные результаты амплификации («+») фрагментов геномов специфичных продуктов по соответствующим каналам детекции (Fam, Rox или Cy5).

9.3 Интерпретация результатов осуществляется в соответствии с таблицей 5. Необходимо учитывать возможность присутствия в образце нуклеиновых кислот нескольких вирусов-возбудителей ОРВИ, в том числе выявляемых в одной амплификационной пробирке.

9.4 В биологических образцах, не содержащих нуклеиновых кислот выявляемых набором реагентов вирусов, и в отрицательном контрольном образце должны быть получены положительные результаты амплификации по показателю РНК-ВК "А" (канал детекции Hex) и отрицательные результаты амплификации («-») фрагментов геномов специфичных продуктов (по каналам Fam, Rox и Cy5).

Результат оценивается программой как недостоверный (нд) в случае отсутствия в амплификационной пробирке положительных результатов по всем каналам.

- 9.5** Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из биологического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторное выделение препарата нуклеиновых кислот, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).
- 9.6** При отсутствии положительного результата (по каналам Fam, Rox и Cy5) в положительном контрольном образце результаты всей постановочной серии бракуют.
- 9.7** При наличии положительного результата (по каналам Fam, Rox или Cy5) в отрицательном контрольном образце (К-), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

ВНИМАНИЕ! При интерпретации результатов исследования рекомендуется применять требования Временных рекомендаций по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV:

Предупреждения

Единичный отрицательный результат исследования не исключает наличие инфекционного процесса.

Отрицательные результаты не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

При получении положительных результатов на коронавирус SARS-CoV-2 на любом из этапов диагностики информация немедленно направляется в региональные органы Роспотребнадзора и Центральный аппарат Роспотребнадзора.

Таблица 5 – Интерпретация результатов исследования анализируемых образцов

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox	Cy5	
Пробирка №1 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Influenza A virus
Ср не указан	Не учитывается	Ср указан	Ср не указан	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
Ср не указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср указан	Обнаружена РНК Influenza B virus
Пробирка №2 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Human parainfluenza virus type 2
Ср не указан	Не учитывается	Ср указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Human parainfluenza virus type 4
Ср не указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср указан	Обнаружена РНК Human coronavirus 229E
Пробирка №3 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена ДНК Human bocavirus
Ср не указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср указан	Обнаружена РНК Human rhinovirus
Пробирка №4 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Human respiratory syncytial virus
Ср не указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср указан	Обнаружена РНК Human coronavirus HKU1
Пробирка №5 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена ДНК Human adenovirus
Ср не указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср указан	Обнаружена РНК Human coronavirus NL63
Пробирка №6 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Human coronavirus OC43
Ср не указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср указан	Обнаружена РНК Human parainfluenza virus type 3
Пробирка №7 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Human parainfluenza virus type 1
Пробирка №8 стрипа				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	Обнаружена РНК Human metapneumovirus
Для всех пробирок				
Ср не указан	Ср указан	Ср не указан	Ср не указан	Не обнаружены нуклеиновые кислоты определяемых вирусов
Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Результат недостоверный

Если для биологического образца регистрируется рост уровня флуоресценции для специфического продукта ранее 25 цикла по Ср, то это говорит о высокой первоначальной концентрации НК соответствующего возбудителя. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата при микст-инфицировании для возбудителя, НК которого присутствует в низкой концентрации.

Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ОТ-ПЦР для выделенного препарата НК с использованием набора реагентов для индивидуального выявления соответствующего вируса или провести повторное взятие биологического материала для исследования инфекционного процесса в динамике.

Вопрос микст-инфицирования изучен не для всех выявляемых вирусов. Например, по литературным данным, совместное инфицирование вирусов Influenza (А или В) и SARS-CoV-2 может встречаться в 0,5-5% случаев, увеличиваясь с возрастом пациентов.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов набора реагентов, в течение всего срока годности.
- 10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Стрипы со смесями для амплификации, запечатанными парафином, ОТ-ПЦР-буфер, внутренний контрольный образец РНК-ВК "А", буфер для растворения и положительный контрольный образец следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Стрипы со смесями для амплификации, запечатанными парафином, следует хранить в защищённом от света месте.
- 10.2.2 Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.
- 10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- стрипы со смесями для амплификации, запечатанными парафином, ОТ-ПЦР-буфер, внутренний контрольный образец РНК-ВК "А", буфер для растворения и положительный контрольный образец следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Стрипы со смесями для амплификации, запечатанными парафином, следует хранить в защищённом от света месте;
 - фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.
- 11.2** Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора реагентов		Нестерильно
	Дата изготовления		

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство (СПП). Медицинские изделия.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документа, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», ООО «ДНК-Технология ТС» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.

Адрес производителя: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ОРВИ Комплекс, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Номер 646-2
2024-04-22

Приложение А (обязательное)

**Сокращенная методика выделения РНК/ДНК
из исследуемого материала (мазки из носоглотки и ротоглотки)
с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС**

Примечание – В случае выпадения осадка в лизирующем растворе, флакон прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

1. Промаркируйте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).
2. Внесите в каждую пробирку по 10 мкл предварительно перемешанного на микроцентрифуге-вортексе внутреннего контрольного образца РНК-ВК "А" из набора реагентов ОРВИ Комплекс.
3. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
4. Внести в пробирки для исследуемых образцов по 100 мкл исследуемого материала. В пробирку, маркированную «К-», добавьте 100 мкл отрицательного контрольного образца.
5. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
6. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
7. Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
8. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
9. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12 000 – 16 000 в течение 10 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.
10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
11. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
12. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12 000 – 16 000 в течение 1 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.
13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
14. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

15. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12 000 – 16 000 в течение 1 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.
16. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником. Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объемом не более 20-30 мкл.
17. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
18. Добавьте к осадку **100 мкл** буфера для растворения, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
19. Прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
20. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12 000 – 16 000 в течение 30 с при температуре от 18 °С до 25 °С.

Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Полученный препарат НК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Для возможности проведения повторного исследования оставшуюся РНК следует сразу же поместить в морозильную камеру и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток, не размораживая до постановки.