ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

828-1 2024-04-22

IVD

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2,
респираторно-синцитиального вируса,
вирусов гриппа А и В (без дифференцирования)
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2023/19830 от 20 марта 2023 года

Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ 4
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 5
2.1 Состав набора реагентов 5
2.2 Количество анализируемых образцов 5
2.3 Принцип метода 5
2.4 Время проведения анализа 7
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 7
3.1 Аналитическая специфичность 7
3.2 Интерферирующие вещества 7
3.3 Предел обнаружения 8
3.4 Диагностические характеристики 9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 9
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 12
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ 13
6.1 Материал для исследования 13
6.2 Особенности взятия биоматериала 13
6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала 13
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 14
7.1 Выделение РНК 14
7.2 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции 16
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ 19
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ 19
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ 21
10.1 Транспортирование 21
10.2 Хранение 21
10.3 Указания по эксплуатации 22
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ 22
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ 22
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ 22
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ 23
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ 23
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ 24
ПРИЛОЖЕНИЕ А. 25
ПРИЛОЖЕНИЕ Б 27

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

COVID-19	- COrona VIrus Disease 2019, коронавирусное заболевание 2019
RSV	- Respiratory syncytial virus (RSV), респираторно-синцитиальный вирус
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
ВК	- внутренний контроль
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
ОРЗ	- острое респираторное заболевание
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, респираторно-синцитиального вируса, вирусов гриппа А и В (без дифференцирования) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, респираторно-синцитиального вируса (RSV), вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) (без дифференцирования) 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 Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 Область применения: набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R3-P448-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная жидкость от бесцветного до розового цвета под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,62 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R3-P448-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная жидкость от бесцветного до розового цвета под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,62 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" [1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

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

2.2 Количество анализируемых образцов

96 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: обратная транскрипция РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени; качественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными

[1] - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"» указывается как «РНК-ВК "А"»

последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК 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 РНК и качества прохождения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

В реакционную смесь 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 респираторно-синцитиального вируса (RSV), включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой кДНК коронавируса SARS-CoV-2 (гены E, N), включена флуоресцентная метка Rox.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой кДНК вируса гриппа A (Influenza A) и вируса гриппа B (Influenza B virus), включена флуоресцентная метка Cy5.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта внутреннего контрольного образца, входит флуоресцентный краситель Hex.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
RSV	ВК*	Коронавирус SARS-CoV-2, гены E, N	Influenza A virus / Influenza B virus	-

* - внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"

Исследование состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификация кДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

Поскольку нельзя исключить возникновения новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2, для повышения надежности диагностики в качестве мишеней выбраны два участка генома: участки гена N и гена E.

В образцах биологического материала, содержащих РНК выявляемых вирусов, во время проведения амплификации детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих РНК выявляемых вирусов, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам детекции отсутствует.

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

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК Human Coronavirus 229E, Human Coronavirus HKU-1, Human Coronavirus NL-63, Human Coronavirus OC-43, Human Metapneumovirus, Human Parainfluenza virus type 1, Human Parainfluenza virus type 2, Human Parainfluenza virus type 3, Human Parainfluenza virus type 4, Human Rhinovirus, MERS-CoV, ДНК Human Adenovirus, Human Bocavirus, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydophila pneumoniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus (methicillin-resistant)*, *Streptococcus pneumoniae*, а также ДНК человека в концентрации до 10^8 копий/мл образца.

В ходе проведения валидационных испытаний показано наличие специфических результатов амплификации при наличии в образце РНК, выделенной из образцов SARS-CoV-2 и Respiratory syncytial virus, полученных в рамках международной системы QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания, а также РНК, выделенной из 15 штаммов гриппа А субтипов A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), а также 11 штаммов гриппа В различных эпидемических сезонов.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие в образцах биологического материала интерферирующих веществ, которые могут ингибировать ПЦР, может являться причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком полного 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 РНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца РНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца РНК.

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

Предел обнаружения: 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку.

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

Предел обнаружения РНК в образце биоматериала зависит от метода пробоподготовки образца и конечного объёма выделенной РНК (объёма элюции).

Предел обнаружения 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации РНК в образце при использовании комплектов/наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот:

Биоматериал	ПРОБА-НК (объем полученного препарата 50 мкл)	ПРОБА-НК-S (объем полученного препарата 50 мкл)	ПРОБА-МЧ-НК-S (объем полученного препарата 100 мкл)	ПРОБА-МЧ DWP (объем полученного препарата 100 мкл)
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды	1000 копий/мл образца	1000 копий/мл образца	2000 копий/мл образца	2000 копий/мл образца
Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	1000 копий/мл образца	Не применяется	Не применяется	Не применяется
Мокрота (предобработка с Na_3PO_4)	2000 копий/мл образца	Не применяется	Не применяется	Не применяется
Мокрота (предобработка с муколизином)	5000 копий/мл образца	Не применяется	Не применяется	Не применяется

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Вирус	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Мазок из носоглотки, ротоглотки	SARS-CoV-2	100% (91,59-100)	100% (96,19-100)
	RSV	100% (87,66-100)	100% (96,67-100)
	Influenza A virus / Influenza B virus	100% (89,72-100)	100% (96,48-100)
Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	SARS-CoV-2	100% (90,00-100)	100% (94,56-100)
	RSV	100% (88,78-100)	100% (94,87-100)
	Influenza A virus / Influenza B virus	100% (91,40-100)	100% (94,04-100)
Мокрота	SARS-CoV-2	100% (86,28-100)	100% (94,22-100)
	RSV	100% (87,66-100)	100% (93,94-100)
	Influenza A virus / Influenza B virus	100% (88,06-100)	100% (93,84-100)
Весь биоматериал	**SARS-CoV-2**	**100% (96,45-100)**	**100% (98,36-100)**
	RSV	**100% (95,85-100)**	**100% (98,46-100)**
	Influenza A virus / Influenza B virus	**100% (96,52-100)**	**100% (98,34-100)**

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», методических рекомендаций МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Согласно методическим рекомендациям МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19»:

Организация лабораторной диагностики COVID-19 осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с микроорганизмами II группы патогенности.

К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей настоящих методических рекомендаций.

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II группы патогенности.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21. Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ).

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

При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Следует использовать только новые наконечники и пробирки.

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

Выделение РНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

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 должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм 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	Наличие/отсутствие опасных компонентов	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	**Азид натрия менее 0,1%**	Является безопасным для конечного пользователя
ОТ-ПЦР-буфер	**Азид натрия менее 0,1%**	Является безопасным для конечного пользователя
Фермент Taq/RT	Нет опасных веществ	-
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	**Азид натрия менее 0,1%**	Является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 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 слизистыми оболочками. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

Не 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 набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов 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 SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс требуются следующие оборудование и материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S, пробирки	Фасовка S, стрипы
ПЦР-бокс	да	да
детектирующий амплификатор планшетного типа: ДТпрайм» (РУ № ФСР 2011/10229), «ДТлайт» (РУ № ФСР 2011/10228), ДТ-96 (РУ № ФСР 2007/01250) ООО «НПО ДНК-Технология»	да	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да
холодильник с морозильной камерой	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да
штатив для дозаторов	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками	да	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения НК:		
бокс биологической безопасности II класса;	да	
термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный), и пробирки с защёлкивающимися крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes, или термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65 °С, и пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;	да	
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора	да	
центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF(g) не ниже 12000	да	
микроцентрифуга-вортекс	да	
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 0,2-20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	
штатив для дозаторов	да	
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	
физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца	да	
транспортная среда		
Комплект/набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала рекомендуется «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009», **комплект ПРОБА-НК**, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867 или «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК-S)» по ТУ 21.20.23-117-46482062-2020, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11296 или «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ-НК-S)» по ТУ 21.20.23-118-46482062-2020, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15267 или «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ DWP)» по ТУ 21.20.23-062-46482062-2020, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15090		

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют биологический материал человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота).

6.2 Особенности взятия биоматериала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» от 30.03.2020.

Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную ёмкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей методических рекомендаций.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» от 30.03.2020.

Таблица 2 – Условия транспортирования и хранения биоматериала

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспор-тирование	Условия хранения до тестирования	Комментарии
Мазок из носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков**	4 °С	≤5 дней: 4 °С >5 дней*: минус 70 °С	Носоглоточные и орофарингеальные тампоны должны быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов*: минус 70 °С	Возможно небольшое разведение образца
Эндотрахеальный аспират, аспират носоглотки или смыв из носа	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов*: минус 70 °С	
Мокрота	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов*: минус 70 °С	Убедитесь, что материал поступает из нижних дыхательных путей
* - При невозможности обеспечить хранение при минус 70 °С, образцы хранить при минус 20 °С ** - 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). Используются зонды-тампоны, предназначенные для взятия мазков из носоглотки и ротоглотки, например, РУ № РЗН 2021/13989				

Комментарий – рекомендуется использовать транспортные среды, содержащие консерванты, например, СТОР-Ф производства ООО «ДНК-Технология ТС» 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 вирусов гриппа, респираторно-синцитиального вируса и 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 РНК. 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 РНК, 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 РНК

Для выделения РНК из мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата, мокроты используют комплекты/ наборы для выделения РНК, зарегистрированные в РФ в установленном порядке.

Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту/набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуемый объём препарата РНК - не более 50 мкл. В случае применения для выделения РНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-НК-S и ПРОБА-МЧ DWP возможно увеличение объёма до 100 мкл.

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

Таблица 3 – Комплекты/наборы реагентов, валидированные для выделения РНК для дальнейшего исследования набором реагентов SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс

Комплект/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**	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота
	ПРОБА-НК (сокращенная методика в соответствии с Приложением А)	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК-S), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11296	**ПРОБА-НК-S**	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ-НК-S), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15267	**ПРОБА-МЧ-НК-S**	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ DWP), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15090.	**ПРОБА-МЧ DWP**	Мазки из носоглотки, ротоглотки

Примечание - Мокрота подлежит предобработке. 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)», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867, раздел «Взятие и подготовка клинического материала» (Мокрота (способ 1 и способ 2)).

7.1.1 Особенности предобработки биоматериала для последующего исследования с применением набора реагентов SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс

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

Для выделения используется **100 мкл образца**.

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 клинические образцы на этапе выделения нуклеиновых кислот.

В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК необходимо использовать **внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" из набора реагентов SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс.**

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

Примечание – Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) и внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) из комплекта реагентов ПРОБА-НК при выделении РНК не используют.

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 подготовить **отрицательный контрольный образец** и провести его через все этапы выделения одновременно с выделением РНК из клинических образцов.

В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор в объёме, указанном в инструкции к набору/комплекту реагентов для выделения нуклеиновых кислот, или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего набора/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 смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 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. Смешайте в отдельной пробирке:

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

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

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT для 9 (8+1) пробирок, т.е. 135 мкл ОТ-ПЦР-буфера + 4,5 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-буфер» и «Фермент 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, 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 и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-НК-S необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом РНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную РНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед использованием следующего. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

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

7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К-», 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

7.2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К+», 10 мкл положительного контрольного образца.

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

7.2.11 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 4.

Таблица 4 – 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						

Примечания:

1. Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объём реакционной смеси и т.п.) в приборах серии ДТ, можно сохранить в виде готового файла.
2. Для CITO диагностики допускается использовать укороченную программу амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм» и «ДТ-96» (Приложение Б).

ВНИМАНИЕ! Не допускается использовать укороченную программу амплификации при проведении рутинных исследований.

3. Для удобства работы при первом проведении ОТ-ПЦР загрузите готовый файл с параметрами теста.
4. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ОТ-ПЦР.

[1] - допускается хранение при температуре 25 °С

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт результатов осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицами 6,7.

9.2 Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов (таблица 5).

Таблица 5 – Интерпретация результатов исследования контрольных образцов

Канал детекции				**Интерпретация результата**
Fam	Hex	Rox	Cy5	
Отрицательный контрольный образец				
Ср не указан	**Ср указан**	Ср не указан	Ср не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец				
Ср указан	Ср не указан	**Ср указан**	**Ср указан**	Положительный результат Результаты постановки валидны

9.3 В биологических образцах, содержащих РНК вирусов, выявляемых набором реагентов, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по соответствующему каналу детекции (Fam, Rox или Cy5) (таблицы 6, 7).

9.4 В биологических образцах, не содержащих РНК вирусов, выявляемых набором реагентов, и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hex (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост флуоресценции по каналам Fam, Rox и Cy5 отсутствует.

9.5 Результат оценивается программой как недостоверный (нд) в случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта (по каналам Fam, Rox и Cy5) и для внутреннего контрольного образца (по каналу Hex).

9.6 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).

Таблица 6 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции				**Интерпретация результата**
Fam	Hex	Rox	Cy5	
Анализируемые образцы				
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	Ср не указан	**Обнаружена РНК респираторно-синцитиального вируса (RSV)**
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 A virus / Influenza B virus**
Ср не указан	**Ср указан**	Ср не указан	Ср не указан	Не обнаружена РНК выявляемых вирусов
Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	Недостоверный результат. Требуется либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно)

Таблица 7 – Другие возможные результаты ПЦР

Канал детекции				**Интерпретация результата**
Fam	Hex	Rox	Cy5	
Анализируемые образцы				
Ср указан	Не учитывается	**Ср указан**	Ср не указан	**Обнаружена РНК респираторно-синцитиального вируса (RSV), обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2**
Ср не указан	Не учитывается	**Ср указан**	**Ср указан**	**Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2, обнаружена РНК Influenza A virus / Influenza B virus**
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	**Ср указан**	**Обнаружена РНК респираторно-синцитиального вируса (RSV), обнаружена РНК Influenza A virus / Influenza B virus**
Ср указан	Не учитывается	**Ср указан**	**Ср указан**	**Обнаружена РНК респираторно-синцитиального вируса (RSV), обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2, обнаружена РНК Influenza A virus / Influenza B virus**

9.7 При отсутствии положительного результата (экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam, Rox и Cy5) в положительном контрольном образце результаты всей постановочной серии бракуют.

9.8 При наличии положительного результата (экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam, Rox или Cy5) в отрицательном контрольном образце (K-), 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, особенно если это образец из верхних дыхательных путей, не исключает инфекции.

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

Если для биологического образца регистрируется рост уровня флуоресценции для специфического продукта ранее 25 цикла по Ср, то это говорит о высокой первоначальной концентрации РНК соответствующего возбудителя. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата при микст-инфицировании для возбудителя, РНК которого присутствует в низкой концентрации. Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ОТ-ПЦР для выделенного препарата РНК с использованием набора реагентов для индивидуального выявления соответствующего вируса.

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 контейнеров, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Для части, хранящейся при температуре от 2 °С до 8 °С, допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Для части, хранящейся при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С, допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера до 25 °С не более 5 суток.

10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной 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:

- все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной 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, повреждением упаковки, 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.

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 применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения *n* тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии (серии)		Нестерильно
	Дата изготовления		

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

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

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

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

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

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

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 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, 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»), Россия.

Адрес производителя:

117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

1) ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская обл. г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.
2) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов SARS-CoV-2/RSV/Грипп 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 828-1
2024-04-22

Сокращенная методика выделения РНК из исследуемого материала (мазки из носоглотки и ротоглотки) с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

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 защёлкивающимися крышками, если необходимо) 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 SARS-CoV-2/RSV/Грипп Комплекс.
3. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
4. В пробирки для исследуемых образцов добавьте по 100 мкл исследуемого материала. В пробирку, маркированную «К-», добавьте 100 мкл отрицательного контрольного образца.
5. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
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 на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
9. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин при комнатной 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) 12000–16000 в течение 1 мин при комнатной 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) 12000–16000 в течение 1 мин при комнатной 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 **50 мкл** буфера для растворения, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с, и осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с.
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) 12000–16000 в течение 30 с при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

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

Полученный препарат РНК 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.

Таблица Б 1 – Укороченная программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм» и «ДТ-96» (допускается использование только для CITO диагностики)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	35	15	0	1		Цикл
2	92	0	30	1		Цикл
3	92	0	10	8		Цикл
	64	0	15		√	
4	90	0	5	40		Цикл
	64	0	15		√	
5	64	0	5	1		Цикл
6	10[1]	…	…	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

[1] - допускается хранение при температуре 25 °С