

1246 2026-02-03



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК

Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica, Bordetella holmesii

методом ПЦР в режиме реального времени

Bordetella Скрин

Регистрационный номер:

Г004-00110-00/04200518 от 30.01.2026

ВНИМАНИЕ! 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.....	6
2.3	Принцип метода	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
3.1	Аналитическая специфичность	7
3.2	Интерферирующие вещества	8
3.3	Предел обнаружения	8
3.4	Диагностические характеристики.....	9
3.5	Воспроизводимость и повторяемость	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1	Материал для исследования	15
6.2	Общие требования	15
6.3	Взятие материала на исследование	15
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	16
6.5	Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	17
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	18
7.1	Выделение ДНК из биологического материала	18
7.2	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	19
7.3	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	21
7.4	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	24
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	26
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	26
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	28
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	29
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	29
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	29
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	30
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ И НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	31
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	32
	Приложение А.....	33
	Приложение Б.....	34
	Приложение В.....	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii* методом ПЦР в режиме реального времени (Bordetella Скрин), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для дифференцированного выявления ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii* в биологическом материале человека (мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки) и бактериальных культурах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного заболевания, вызванного *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii*.

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: врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P039-S3/4, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	6 шт.		

REF R1-P039-23/4, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	48 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P039-UA/9, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
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.

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
- Инструкция по применению – 1 экз.
- Вкладыш – 1 экз.
- Паспорт – 1 экз.

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 48 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов: в режиме реального времени; мультиплексный качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. «Горячий» старт для фасовки S обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах. «Горячий» старт для фасовки U обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических продуктов амплификации. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК *Bordetella pertussis*, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК *Bordetella bronchiseptica*, включена флуоресцентная метка Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК *Bordetella parapertussis*, включена флуоресцентная метка Cy5.

В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации ДНК *Bordetella holmesii*, включена флуоресцентная метка Cy5.5. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок и биоматериала, необходимого для проведения исследования, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Bordetella pertussis</i>	ВК	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella holmesii</i>

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов Bordetella Скрин.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* или *Bordetella holmesii* при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительные результаты амплификации специфических продуктов (фрагменты геномов *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* или *Bordetella holmesii*) по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* или *Bordetella holmesii* программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательные результаты амплификации специфических продуктов (фрагменты геномов *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* или *Bordetella holmesii*) по заявленным каналам детекции¹ и положительный результат амплификации внутреннего контроля (ВК) по каналу детекции Hex.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК Influenza virus A(H3N2), Influenza virus A(H1N1pdm09), Influenza B virus, Human Coronavirus 229E, Human Coronavirus HKU-1, Human Coronavirus NL-63, Human Coronavirus OC-43, Human Metapneumovirus, Human Parainfluenza virus type 2, Human Parainfluenza virus type 3, Human Parainfluenza virus type 4, Human Parainfluenza virus type 1, Human Rhinovirus, Respiratory syncytial virus, SARS-CoV-2, ДНК Human Adenovirus,

¹ – допускается значение Cp/Cq ≥ 39

Human Bocavirus, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant), *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, а также ДНК человека в концентрации до 20 нг/мкл.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых/недостовверных) результатов. Признаком полного ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

К ингибиторам ПЦР отнесены следующие эндогенные и экзогенные интерферирующие вещества: гемоглобин и лекарственные препараты (хлоргексидин биглюконат, Мирамистин®, Назол Бэби, Отривин Бэби, Лазолван®, Пиносол®, РИНОФЛУИМУЦИЛ®, Тизин® Классик, Спрей Тантум® Верде, Гексорал® Раствор, Беродуал®, Пульмикорт® суспензия для ингаляции), находящиеся в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, остающиеся в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК.

Для всех исследуемых лекарственных препаратов было показано отсутствие их влияния в концентрации до 20% в образце биоматериала.

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 составляет 5 копий ДНК каждого микроорганизма на амплификационную пробирку.

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

Предел обнаружения соответствует следующим значениям концентрации ДНК при использовании указанных наборов/комплектов реагентов для выделения НК и конечного объёма элюции (разведения) выделенной ДНК:

Биоматериал	Наименование набора/комплекта для выделения ДНК	Объём полученного препарата, мкл	Предел обнаружения, копий/образец
Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки в транспортной среде	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-НК-ПЛЮС	100	100
	ПРОБА-МЧ-РАПИД II	100	100
	ПРОБА-ОПТИМА ¹	500	500
	ПРОБА-РАПИД	500	500
Бактериальные культуры в транспортной среде ²	ПРОБА-ОПТИМА	500	500
	ПРОБА-НК-ПЛЮС	300	300

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Патоген	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Мазки со слизистой носоглотки	<i>Bordetella pertussis</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Bordetella parapertussis</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
	<i>Bordetella holmesii</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
Мазки со слизистой ротоглотки	<i>Bordetella pertussis</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Bordetella parapertussis</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
	<i>Bordetella holmesii</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
Бактериальные культуры	<i>Bordetella pertussis</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	<i>Bordetella parapertussis</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	
	<i>Bordetella holmesii</i>	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	

3.5 Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость составляет 100%.

Повторяемость составляет 100%.

¹ – в качестве транспортной среды использовалась Транспортная среда для биопроб STOP-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640

² – в качестве транспортной среды использовался стерильный физиологический раствор

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, 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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов 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 санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, 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.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к 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, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (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 опасного компонента		Указание на риски
	Фасовка S	Фасовка U	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–	–
Раствор Таq-полимеразы	Нет опасных веществ	–	–
Минеральное масло	Нет опасных веществ	–	–
Смесь для амплификации	–	Нет опасных веществ	–
Полимераза ТехноТаq МАХ	–	Нет опасных веществ	–
ПЦР-буфер	–	Нет опасных веществ	–
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует 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 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 требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное ²
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	да	да
микроцентрифуга-вортекс ³	да	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник или холодильная камера	да	да	да	да
морозильная камера	нет	нет	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	да
наконечники одноразовые с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	нет	нет	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок ²	нет	нет	да	да ⁵
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да	да
контейнер для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12М1 или 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим 12М1 или 15М1	да ⁶	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	да ⁶	нет	нет	да
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	нет	да ⁷	да
центрифуга с адаптером для микропланшетов ПЦР, обеспечивающая RCF(g) 100	нет	нет	да ⁷	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов ПЦР	нет	нет	да ⁷	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да ⁸

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное ²
транспортная среда, рекомендуется использовать Транспортную среду для биопроб СТОР-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640				
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ⁹ , рекомендуются: <ul style="list-style-type: none"> – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в формах комплектации: комплект ПРОБА-НК, комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; – Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД) по ТУ 9398-015-46482062-2008, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/02939; – Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) по ТУ 21.20.23-124-46482062-2021, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496; – Набор реагентов для выделения ДНК/РНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека (ПРОБА-МЧ-РАПИД II), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2024/23205. 				
Примечания к таблице: <ul style="list-style-type: none"> ¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже ² – не используется для детектирующего амплификатора «ДТлайт» ³ – рекомендуется Встряхиватель лабораторный медицинский «ДТспин» по ТУ 32.50.50-003-96301278-2024, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24070; ротор для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл входит в комплектацию ⁴ – только при использовании пробирок ⁵ – только микропланшеты ПЦР ⁶ – в случае использования автоматизированного дозирования ⁷ – при использовании микропланшетов ПЦР ⁸ – для работы с микропланшетами ПЦР 384 лунки валидированы детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм 5X*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229; «ДТпрайм II» (модификация «ДТпрайм II 5X*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179 ⁹ – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала (7.1) 				

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объёмом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм 5М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм II» по ТУ 26.51.53-001-96301278-2022 (модификация «ДТпрайм II 5М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179, далее по тексту – «ДТпрайм II»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм 5Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования при использовании микропланшетов ПЦР 384 лунки), далее по тексту – «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм 5Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм II» по ТУ 26.51.53-001-96301278-2022 (модификация «ДТпрайм II 5Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования при использовании микропланшетов ПЦР 384 лунки), далее по тексту – «ДТпрайм II» в модификации «ДТпрайм II 5Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт 5S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228 (только для набора реагентов в фасовке S; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок), далее по тексту – «ДТлайт»;
- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), Био-Рад Лабораториз, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399, далее по тексту – CFX96;

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки и бактериальные культуры.

6.2 Общие требования

6.2.1 Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

6.2.2 Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

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

6.2.4 На этапе подготовки биоматериала используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.2.5 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа (внесение образца/реактива, удаление надсадочной жидкости), и закрывайте её перед работой со следующей пробиркой. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

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, а также МУК 4.2.3701-21 «Лабораторная диагностика коклюша и других заболеваний, обусловленных другими бордетеллами».

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК может потребоваться подготовка образцов биологического материала (6.5).

6.3.1 Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной в зависимости от источника биологического материала процедуре (например, Зонд медицинский одноразовый стерильный, РУ № РЗН 2021/13989).

Взятие биологического материала осуществляется со слизистой носоглотки или задней стенки ротоглотки.

В целях проведения дифференциальной диагностики рекомендуется исследовать оба типа мазков от каждого пациента. В этом случае рекомендуется объединять и исследовать как один образец оба мазка, собранных последовательно разными зондами в одну пробирку (МУК 4.2.3701-21 «Лабораторная диагностика коклюша и других заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»).

Ограничение метода: приём пищи менее чем за 2 часа до исследования; использование медикаментов, орошающих носоглотку или ротоглотку, и препаратов для рассасывания во рту менее чем за 6 часов до исследования. Взятие биологического материала проводят до применения других видов исследования или процедур (в том числе полосканий), при хорошем освещении.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-РАПИД:

ВНИМАНИЕ! Взятие материала в пробирки с реактивом «Проба-Рапид» осуществляется сухим зондом! Необходимо исключить контакт раствора с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

После взятия материала перенесите зонд в пробирку с реактивом «Проба-Рапид» и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания. 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 и промаркируйте пробирку.

6.3.2 Бактериальные культуры

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС:

Взятие бактериальных культур с жидких и плотных сред проводится в одноразовые пластиковые пробирки объёмом 1,5–2,0 мл, в которые предварительно внесено 0,5–1,0 мл стерильного физиологического раствора.

При помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя помещают в каждую пробирку одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды.

После взятия материала пробирки плотно закрывают и маркируют.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала определяются инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Допускается хранение образцов биологического материала при следующих условиях (если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектam реагентов для выделения НК или используемым для транспортирования и хранения образцов транспортным средам):

Таблица 2 – Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала перед выделением ДНК

Биоматериал	Температура хранения и транспортирования	Время до выделения ДНК
Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки	от 2 °С до 8 °С	не более 24 часов
	от минус 22 °С до минус 18 °С	не более 1 месяца
Бактериальные культуры (взвесь культуры в физиологическом растворе)	от 2 °С до 8 °С	не более 24 часов
	от минус 22 °С до минус 18 °С	не более 7 суток
	минус 70 °С	длительно

ВНИМАНИЕ! Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов, за исключением бактериальных культур.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

Для бактериальных культур при использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС:

6.5.1 Центрифугируйте пробирку с образцом в физиологическом растворе при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин.

6.5.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Образец готов для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения на медицинское изделие и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ-РАПИД II (таблица 3).

Таблица 3 – Наборы/комплекты реагентов, рекомендованные для выделения ДНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов Bordetella Скрин

Набор/комплект реагентов, РУ	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
Комплект реагентов ПРОБА-НК РУ № ФСР 2010/08867	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки	50
	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки (сокращённая методика в соответствии с Приложением В)	
Комплект реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС, РУ № ФСР 2010/08867	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки	100
	Бактериальные культуры	300
	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки (сокращённая методика в соответствии с Приложением В)	100
Комплект реагентов ПРОБА-РАПИД, РУ № ФСР 2008/02939	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки	500
Набор реагентов ПРОБА-ОПТИМА, РУ № РЗН 2022/17496	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки, бактериальные культуры	500
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД II, РУ № РЗН 2024/23205	Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки	100

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора/комплекта реагентов или в соответствии с Приложением В в случае использования комплектов реагентов ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС для выделения ДНК по сокращённой методике.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объёме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. 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!
3. Для набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» предусмотрена возможность автоматизированного дозирования с использованием дозирующего устройства ДТстрим согласно руководству по эксплуатации.

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

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

- 7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.2.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.
- 7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте пробирки/стрипы крышками.
- 7.2.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирку с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК 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 началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.10 Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

7.2.12 Для детектирующего амплификатора CFX96:

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 5.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт» (фасовка S)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFХ96 (фасовки S, U)

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	00:15	50
4	64 √	00:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex, Rox, Cy5, Cy5.5) при 64 °С

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объемом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок², герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постаmplификационной контаминации.

2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых амплификационных пробирок объемом 0,2 мл или микропланшет ПЦР 96 лунок для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

² – для детектирующего амплификатора «ДТлайт» микропланшеты ПЦР 96 лунок не используются

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки/зарезервировать 4 лунки микропланшета для неизвестных образцов, одну пробирку/лунку для «К-» и одну пробирку/лунку для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 6.

7.3.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.3.3 Внесите во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.

7.3.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаг МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаг МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаг МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

– 6,0 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,

– 0,3 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТаг МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К-», «К+».

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца, «К-», «К+». Промаркированных пробирок/необходимых лунок микропланшета – 6. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаг МАХ для 7 (6+1) пробирок/лунок, т.е. 42 мкл ПЦР-буфера + 2,1 мкл полимеразы ТехноТаг МАХ.

7.3.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаг МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаг МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.3.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаг МАХ. Неплотно закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаг МАХ в пробирки/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.3.8 – 7.3.14.

7.3.8 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.3.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.

7.3.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К–», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.3.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.12 В случае использования микропланшетов ПЦР 96 лунок:

7.4.12.1. Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.4.12.2. Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.4.12.3. Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.13 В случае использования пробирок:

Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в детектирующий амплификатор и проведите ПЦР (7.3.15, 7.3.16).

7.3.15 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.3.14) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 6.

7.3.16 Для детектирующего амплификатора CFX96:

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 5.

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт» (фасовка U)

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим²

ВНИМАНИЕ!

- Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 96 лунок или 384 лунки³, герметизируемые термоплёнкой.
- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

7.4.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

² – только для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II», CFX96

³ – только для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» в модификациях «ДТпрайм 5X*», «ДТпрайм II 5X*»

7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ.

7.4.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с

7.4.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ, пробирки или глубоколоночный планшет с препаратами ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.4.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.4.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.

7.4.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.4.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 6.

7.4.12 Для детектирующего амплификатора CFX96:

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 5.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Setting» необходимо выбрать «Baseline Subtracted Curve Fit».

9.3 Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 7. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! В случаях микст-инфекции возможно одновременное выявление ДНК двух видов микроорганизмов по соответствующим каналам детекции.

9.4 Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.5 При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.6 При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

Таблица 7 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции										Интерпретация результата
Fam, Cp/Cq		Hex, Cp/Cq	Rox, Cp/Cq		Cy5, Cp/Cq		Cy5.5, Cp/Cq			
Фасовка S	Фасовка U		Фасовка S	Фасовка U	Фасовка S	Фасовка U	Фасовка S	Фасовка U		
Неизвестные образцы										
< 36	< 35	Не учитывается	Не учитывается		Не учитывается		Не учитывается		Обнаружена ДНК <i>Bordetella pertussis</i>	
≥ 36, но < 39	≥ 35, но < 39	Не учитывается	Не учитывается		Не учитывается		Не учитывается		Низкое содержание ДНК <i>Bordetella pertussis</i> , сомнительный результат*	
Не учитывается		Не учитывается	< 36	< 35	Не учитывается		Не учитывается		Обнаружена ДНК <i>Bordetella bronchiseptica</i>	
Не учитывается		Не учитывается	≥ 36, но < 39	≥ 35, но < 39	Не учитывается		Не учитывается		Низкое содержание ДНК <i>Bordetella bronchiseptica</i> , сомнительный результат*	
Не учитывается		Не учитывается	Не учитывается		< 36	< 35	Не учитывается		Обнаружена ДНК <i>Bordetella parapertussis</i>	
Не учитывается		Не учитывается	Не учитывается		≥ 36, но < 39	≥ 35, но < 39	Не учитывается		Низкое содержание ДНК <i>Bordetella parapertussis</i> , сомнительный результат*	
Не учитывается		Не учитывается	Не учитывается		Не учитывается		< 36	< 35	Обнаружена ДНК <i>Bordetella holmesii</i>	
Не учитывается		Не учитывается	Не учитывается		Не учитывается		≥ 36, но < 39	≥ 35, но < 39	Низкое содержание ДНК <i>Bordetella holmesii</i> , сомнительный результат*	
Не указан или ≥ 39		Указан	Не указан или ≥ 39		Не указан или ≥ 39		Не указан или ≥ 39		Не обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов	
Не указан или ≥ 39		Не указан	Не указан или ≥ 39		Не указан или ≥ 39		Не указан или ≥ 39		Недоверенный результат	
Отрицательный контрольный образец										
Не указан или ≥ 39		Указан	Не указан или ≥ 39		Не указан или ≥ 39		Не указан или ≥ 39		Отрицательный результат Результаты постановки валидны	
Положительный контрольный образец										
Указан		Не учитывается	Указан		Указан		Указан		Положительный результат Результаты постановки валидны	
* – полученный результат указывает на содержание ДНК выявляемого микроорганизма на уровне предела обнаружения, что может быть связано с низкой нагрузкой микроорганизма в неизвестном образце, с перекрёстной контаминацией высококопийными образцами или с ингибированием ПЦР. Результат может быть не подтверждён при повторном исследовании. Следует однократно провести повторное взятие биоматериала и/или повторное выделение ДНК и проведение ПЦР. В случае повторения результата следует выдать итоговое заключение «Обнаружена ДНК ...».										

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

10.1.2 Фасовка S

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Фасовка U

10.1.3.1 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера 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 Фасовка S

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 Фасовка U

10.2.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °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 полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °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, 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 применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействия солнечного света
	Нестерильно

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ И НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ТУ 20.59.52-044-89545560-2025 Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii* методом ПЦР в режиме реального времени (Bordetella Скрин)

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 ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

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

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 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:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г.о. Серпухов, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, 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

Приложение А

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт» при использовании набора реагентов Bordetella Скрин в фасовке S

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объем реакционной смеси – 35 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Bordetella pertussis</i>	ВК	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella holmesii</i>

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение Б

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт» при использовании набора реагентов Bordetella Скрин в фасовке U

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объем реакционной смеси – 18 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Bordetella pertussis</i>	ВК	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella holmesii</i>

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение В**Сокращённая методика выделения нуклеиновых кислот из исследуемого материала (мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки) с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС****ВНИМАНИЕ!**

1. Перед началом работы необходимо:
 - включить термостат для прогрева до 65 °С;
 - достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка необходимо прогреть флакон с лизирующим раствором на термостате, предварительно прогревом до 65 °С, до полного растворения осадка. Затем следует перемешать раствор переворачиванием флакона вверх дном 5–10 раз, избегая пенообразования. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение приблизительно 12 часов.
2. При прогревании пробирок с образцами возможно открывание крышек! Следует использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).
 1. Промаркируйте одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл для отрицательного контрольного образца (К-).
 2. Внесите в каждую промаркированную пробирку с подготовленным для исследования материалом в объёме 100 мкл (см. 6.5) и в пробирку, промаркированную «К-», по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
 3. Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца.
 4. Плотно закройте пробирки, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 5. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
 6. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 7. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 8. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 10 мин.
 9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
 10. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закройте пробирки и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.

11. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
13. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закройте пробирки и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
14. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
15. Не задевая осадок, удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объёмом не более 20–30 мкл.
16. Откройте пробирки и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
17. Добавьте к осадку соответствующее количество буфера для растворения согласно инструкции по применению комплекта реагентов ПРОБА-НК или ПРОБА-НК-ПЛЮС, осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
18. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
19. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12000–16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С не более одного месяца или при температуре от минус 72 °С до минус 68 °С не более одного года.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, затем встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.



1176 2025-10-16



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii*
методом ПЦР в режиме реального времени

Coxiella burnetii

Регистрационный номер
Г004-00110-00/03380178 от 13.10.2025

ВНИМАНИЕ! 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.....	6
2.3	Принцип метода	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
3.1	Аналитическая специфичность	7
3.2	Интерферирующие вещества	7
3.3	Предел обнаружения	8
3.4	Диагностические характеристики.....	9
3.5	Воспроизводимость и повторяемость	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1	Материал для исследования	15
6.2	Общие требования	15
6.3	Взятие материала на исследование	15
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	17
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	19
7.1	Выделение ДНК из биологического материала	19
7.2	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	20
7.3	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	25
7.4	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*»).....	28
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	30
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	31
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	32
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	33
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	33
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	34
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	35
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	36
	Приложение А.....	37
	Приложение Б.....	38
	Приложение В.....	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* методом ПЦР в режиме реального времени (*Coxiella burnetii*), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, плевральная жидкость, спинномозговая жидкость, кровь, биоптаты, секционный материал) методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекции, вызванной *Coxiella burnetii*.

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: врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P013-S3/4, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	6 шт.		

REF R1-P013-23/4, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	48 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P013-UA/9, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
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.

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
- Инструкция по применению – 1 экз.
- Вкладыш – 1 экз.
- Паспорт – 1 экз.

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 48 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов: в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для фасовки S методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах. «Горячий» старт для фасовки U обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических продуктов амплификации. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации ДНК *Coxiella burnetii*, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации внутреннего контроля (ВК), входит флуоресцентный краситель Hex. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex/Vic	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Coxiella burnetii</i>	ВК	–	–	–

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов *Coxiella burnetii*.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *Coxiella burnetii*, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Coxiella burnetii*) по каналу детекции Fam.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Coxiella burnetii* программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Coxiella burnetii*) по каналу детекции Fam и положительный результат амплификации внутреннего контроля (ВК) по каналу детекции Hex/Vic.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК Influenza virus A(H3N2), Influenza virus A(H1N1pdm09), Influenza B virus, Human Coronavirus 229E, Human Coronavirus HKU-1, Human Coronavirus NL-63, Human Coronavirus OC-43, Human Metapneumovirus, Human Parainfluenza virus type 2, Human Parainfluenza virus type 3, Human Parainfluenza virus type 4, Human Parainfluenza virus type 1, Human Rhinovirus, MERS-CoV, Respiratory syncytial virus, SARS-CoV-2, ДНК Human Adenovirus, Human Bocavirus, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant), *Streptococcus pneumoniae*, а также ДНК человека в концентрации до $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца

3.2 Интерферирующие вещества

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

К ингибиторам ПЦР отнесены следующие вещества: гемоглобин и лекарственные препараты, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в процессе выделения ДНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК.

Для оценки возможной интерференции лекарственных препаратов были выбраны те, которые потенциально могут присутствовать в остаточных количествах в биологических образцах человека, взятых из соответствующих исследуемых биотопов (хлоргексидин биглюконат, Лазолван® РИНО, РИНОФЛУИМУЦИЛ®, Тизин® Классик, Спрей Тантум® Верде, Гексорал® Раствор, Беродуал®, Сальбутамол-Тева, Гриппферон® Капли назальные).

Для всех исследуемых лекарственных препаратов было показано отсутствие их влияния в концентрации до 10% в образце биоматериала.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5 копий ДНК *Coxiella burnetii* на амплификационную пробирку.

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

Предел обнаружения 5 копий ДНК на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации ДНК при использовании указанных наборов/комплектов реагентов для выделения НК и конечного объёма элюции (разведения) выделенной ДНК:

Биоматериал	Наименование набора/комплекта для выделения ДНК	Объём полученного препарата, мкл	Предел обнаружения, копий/образец
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды ¹	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-НК-ПЛЮС	300	300
	ПРОБА-РАПИД	500	500
	ПРОБА-МЧ-РАПИД	100	100
	ПРОБА-ОПТИМА	400	400
	ПРОБА-МЧ-РАПИД II	100	100
Бронхоальвеолярный лаваж, мокрота, плевральная жидкость (при выделении из 500 мкл образца), Назофарингеальный и эндотрахеальный аспираты (при выделении из 1,0 мл образца)	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-НК-ПЛЮС	300	300
Спинномозговая жидкость (при выделении из 500 мкл образца)	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-НК-ПЛЮС	300	300
	ПРОБА-МЧ-РАПИД	100	100
	ПРОБА-РАПИД	500	500
Спинномозговая жидкость (при выделении из 1,0 мл образца)	ПРОБА-ОПТИМА	400	400
Биоптаты	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-ОПТИМА	400	400
Биоптаты, секционный материал	ПРОБА-НК	50	50
Цельная периферическая кровь (500 мкл ²)	ПРОБА-ОПТИМА МАКС	100	100
Цельная периферическая кровь (100 мкл)	ПРОБА-МЧ МАКС	50	50

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Мазок из носоглотки	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Мазок из ротоглотки	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Бронхоальвеолярный лаваж	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Эндотрахеальный аспират	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Назофарингеальный аспират	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Мокрота	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Плевральная жидкость	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Спинномозговая жидкость (ликвор)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Цельная периферическая кровь	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Биопат	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Секционный материал	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Итого	100% (95% ДИ: 98,67% – 100%)	100% (95% ДИ: 98,67% – 100%)

3.5 Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость составляет 100%.

Повторяемость составляет 100%.

¹ – в качестве транспортной среды использовалась Транспортная среда для биопроб STOP-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640

² – при добавлении 100 мкл лизирующего раствора

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, 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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов 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 санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, 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.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к 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 ДНК 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, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (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 опасного компонента		Указание на риски
	Фасовка S	Фасовка U	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–	–
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	–	–
Минеральное масло	Нет опасных веществ	–	–
Смесь для амплификации	–	Нет опасных веществ	–
Полимераза ТехноTaq MAX	–	Нет опасных веществ	–
ПЦР-буфер	–	Нет опасных веществ	–
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует 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 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 требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	да	да ²
микроцентрифуга-вортекс ³	да	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	да
наконечники одноразовые с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок ⁵	нет	нет	да	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да	да
устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12M1 или 15M1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим	нет	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	нет	нет	да
устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	нет	да ⁶	да
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов ПЦР	нет	нет	да ⁶	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов ПЦР	нет	нет	да ⁶	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное
транспортная среда (при необходимости), рекомендуется использовать Транспортную среду для биопроб СТОР-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640 или транспортную среду, рекомендованную в инструкции по применению используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК				
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ⁷ , рекомендуются: – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в формах комплектации: комплект ПРОБА-НК, комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; – Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД) по ТУ 9398-015-46482062-2008, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/02939; – Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) по ТУ 9398-088-46482062-2016 в комплектации ПРОБА-МЧ-РАПИД, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2017/5753; – Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391; – Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) ⁸ по ТУ 21.20.23-124-46482062-2021, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496; – Набор реагентов для выделения ДНК/РНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека (ПРОБА-МЧ-РАПИД II) по ТУ 21.20.23-136-46482062-2023, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2024/23205.				
Дополнительно для предобработки бронхоальвеолярного лаважа, плевральной жидкости, назофарингеального и эндотрахеального аспирата:				
бокс биологической безопасности II класса				
центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, обеспечивающая RCF(g) 12000				
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей				
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора				
дезинфицирующий раствор				
Дополнительно для предобработки и выделения ДНК из биоптатов и секционного материала с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК:				
бокс биологической безопасности II класса				
центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, обеспечивающая RCF(g)12000				
термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65 °С				
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей				
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора				
дезинфицирующий раствор				
Примечания к таблице:				
¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже ² – валидированы детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм *X*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229; «ДТпрайм II» (модификация «ДТпрайм II *X*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179 ³ – рекомендуется Встряхиватель лабораторный медицинский «ДТспин» по ТУ 32.50.50-003-96301278-2024, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24070; ротор для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл входит в комплектацию ⁴ – только при использовании пробирок ⁵ – не используется для детектирующего амплификатора «ДТлайт» ⁶ – только при использовании микропланшетов ПЦР ⁷ – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК <i>Coxiella burnetii</i> определяется видом биологического материала (7.1) ⁸ – для выделения ДНК из крови только в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС				

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объёмом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм II» по ТУ 26.51.53-001-96301278-2022 (модификация «ДТпрайм II *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179, далее по тексту – «ДТпрайм II»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования), далее по тексту – «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм II» по ТУ 26.51.53-001-96301278-2022 (модификация «ДТпрайм II *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования), далее по тексту – «ДТпрайм II» в модификации «ДТпрайм II *Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228 (только для набора реагентов в фасовке S; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок), далее по тексту – «ДТлайт»;
- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), Био-Рад Лабораториз, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399, далее по тексту – CFX96;
- Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446, далее по тексту – Applied Biosystems QuantStudio 5.

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокроту, плевральную жидкость, спинномозговую жидкость, кровь, биоптаты, секционный материал.

6.2 Общие требования

6.2.1 Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

6.2.2 Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

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

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

6.2.3 На этапе подготовки биоматериала используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.2.4 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа (внесение образца/реактива, удаление надсадочной жидкости), и закрывайте её после этого. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

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 и СанПиН 3.3686-21.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК может потребоваться подготовка образцов биологического материала (6.5).

Ограничение метода¹: 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.

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам реагентов для выделения НК

6.3.1 Мазки из носоглотки, ротоглотки

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной в зависимости от источника биологического материала процедуре (например, Зонд медицинский одноразовый стерильный, РУ № РЗН 2021/13989).

ВНИМАНИЕ! Взятие материала в пробирки с реактивом «Проба-Рапид» осуществляется сухим зондом! Необходимо исключить контакт раствора с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

Порядок взятия материала:

После взятия материала перенесите зонд в пробирку с физиологическим раствором, реактивом «Проба-Рапид», лизирующим раствором или транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

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 и промаркируйте пробирку.

6.3.2 Бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС:

Взятие материала производится в пустые одноразовые плотно заворачивающиеся пробирки объемом до 50 мл.

В пробирку собирают биоматериал в количестве не менее 500 мкл. После взятия материала пробирку плотно закрывают.

6.3.3 Эндотрахеальный, назофарингеальный аспират

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС:

Взятие материала производится в пустые одноразовые плотно заворачивающиеся пробирки объемом до 50 мл.

В пробирку собирают биоматериал в количестве не менее 1,0 мл. После взятия материала пробирку плотно закрывают.

6.3.4 Мокрота, спинномозговая жидкость

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

6.3.5 Периферическая кровь

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

Ограничение метода¹: внутривенные инъекции гепарина, инфузии препаратов для парентерального питания – менее чем за 6 часов до исследования.

6.3.6 Биоптаты, секционный материал

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК:

Взятие материала проводится в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала определяются инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Допускается хранение образцов биологического материала при следующих условиях (если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплексам реагентов для выделения НК или используемым для транспортирования и хранения образцов транспортным средствам):

Таблица 2 – Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала перед выделением ДНК

Биоматериал	Температура хранения и транспортирования	Время до выделения ДНК
Биоптаты Секционный материал	от 2 °С до 8 °С	не более 24 часов
	от минус 22 °С до минус 18 °С	не более 7 суток
	минус 70 °С	длительно
Бронхоальвеолярный лаваж Назофарингеальный, эндотрахеальный аспират Плевральная жидкость	от 2 °С до 8 °С	не более 24 часов
	от минус 22 °С до минус 18 °С	не более 7 суток
Кровь Спинномозговая жидкость	от 18 °С до 25 °С	не более 2 часов
	от 2 °С до 8 °С	не более 6 часов
Мазки из носоглотки, ротоглотки	от 2 °С до 8 °С	не более 24 часов
	от минус 22 °С до минус 18 °С	не более 1 месяца
Мокрота	от 18 °С до 25 °С	не более 6 часов
	от 2 °С до 8 °С	не более 3 суток

ВНИМАНИЕ! Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплексам реагентов для выделения НК

- 6.5** Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК
- 6.5.1 Мазки из носоглотки, ротоглотки, мокрота, спинномозговая жидкость, кровь
Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).
- 6.5.2 Бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость
- 6.5.2.1 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл 500 мкл материала.
- 6.5.2.2 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин.
- 6.5.2.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 6.5.2.4 Добавьте к осадку 500 мкл стерильного физиологического раствора.
- 6.5.2.5 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин.
- 6.5.2.6 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 6.5.2.7 Плотнo закройте пробирки.
Образец готов для выделения ДНК.
- 6.5.3 Назофарингеальный и эндотрахеальный аспираты
- 6.5.3.1 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл 1,0 мл материала.
- 6.5.3.2 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин.
- 6.5.3.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).
- 6.5.3.4 Плотнo закройте пробирки.
Образец готов для выделения ДНК.
- 6.5.4 Биоптаты, секционный материал
Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).
При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК:
- 6.5.4.1 Встряхните пробирки с биоматериалом на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3–5 с.
- 6.5.4.2 Удалите надосадочную жидкость.
Образец готов для выделения ДНК (7.2)

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения на медицинское изделие и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ МАКС, ПРОБА-МЧ-РАПИД II (таблица 3).

Таблица 3 – Наборы/комплекты реагентов, рекомендованные для выделения ДНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов Coxiella burnetii

Набор/комплект реагентов, РУ	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
Комплект реагентов ПРОБА-НК РУ № ФСР 2010/08867	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, плевральная жидкость, спинномозговая жидкость, биоптаты, секционный материал	50
	Мазки из носоглотки, ротоглотки (сокращённая методика в соответствии с Приложением В)	
Комплект реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС, РУ № ФСР 2010/08867	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, плевральная жидкость, спинномозговая жидкость	300
	Мазки из носоглотки, ротоглотки (сокращённая методика в соответствии с Приложением В)	
Комплект реагентов ПРОБА-РАПИД, РУ № ФСР 2008/02939	Мазки из носоглотки, ротоглотки, спинномозговая жидкость	500
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, РУ № РЗН 2017/5753	Мазки из носоглотки, ротоглотки, спинномозговая жидкость	100
Набор реагентов ПРОБА-ОПТИМА, РУ № РЗН 2022/17496	Цельная периферическая кровь ¹	100
	Мазки из носоглотки, ротоглотки, спинномозговая жидкость, биоптаты, секционный материал	400
Набор реагентов ПРОБА-МЧ МАКС, РУ № РЗН 2021/14391	Цельная периферическая кровь	50
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД II, РУ № РЗН 2024/23205	Мазки из носоглотки, ротоглотки	100

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора/комплекта реагентов.

¹ – только с использованием набора реагентов в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС

ВНИМАНИЕ!

1. Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

2. Выделение ДНК из биоптатов и секционного материала с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК проводится согласно данной инструкции (7.2).

7.2 Выделение ДНК из биоптатов и секционного материала с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

7.2.1 Общие требования

7.2.1.1 Используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз. Используемые наконечники меняйте при каждом удалении раствора из пробирки. При работе с аспиратором используйте наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз.

7.2.1.2 При добавлении раствора в пробирку, содержащую биологический материал, вносите раствор аккуратно, не касаясь стенок пробирки. При касании стенки пробирки смените наконечник.

7.2.1.3 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить раствор или из которой будете удалять надосадочную жидкость, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

7.2.1.4 Неизвестные образцы и отрицательный контрольный образец (К-) необходимо обрабатывать по единой схеме одновременно согласно данной инструкции.

7.2.2 Выделение ДНК**ВНИМАНИЕ!**

1. Перед началом работы необходимо:

- включить термостат для прогрева до 65 °С;
- достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка необходимо прогреть флакон с лизирующим раствором на термостате, предварительно прогревом до 65 °С, до полного растворения осадка. Затем следует перемешать раствор переворачиванием флакона вверх дном 5–10 раз, избегая пенообразования. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение приблизительно 12 часов.

2. При прогревании пробирок с образцами возможно открывание крышек! Следует использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

- 7.2.2.1 Промаркируйте по одной одноразовой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл для каждого неизвестного образца и для отрицательного контрольного образца (К-).
- 7.2.2.2 Добавьте в пробирки с подготовленными образцами биоптатов и секционного материала (см. 6.5.4) и в пробирку «К-» по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.
- 7.2.2.3 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца. Плотно закройте пробирки, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.2.2.4 Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 30 мин, центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.2.2.5 Перенесите в соответствующие промаркированные пробирки для неизвестных образцов надосадочную жидкость. Для пробирки «К-» переносить надосадочную жидкость не требуется.
- 7.2.2.6 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, не касаясь края пробирки, плотно закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.2.2.7 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 15 мин.
- 7.2.2.8 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.2.9 Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, не касаясь края пробирки, плотно закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3–5 раз.
- 7.2.2.10 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 5 мин.
- 7.2.2.11 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.2.12 Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, не касаясь края пробирки, плотно закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3–5 раз.
- 7.2.2.13 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 5 мин.
- 7.2.2.14 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.2.15 Откройте пробирки и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 7.2.2.16 Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения. Плотно закройте пробирки.
- 7.2.2.17 Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.2.2.18 Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 10 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.2.2.19 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 в течение 30 с.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С не более одного месяца или при температуре от минус 72 °С до минус 68 °С не более одного года.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, затем встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. 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!

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

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример :

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

- 7.3.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.3.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.
- 7.3.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте пробирки/стрипы крышками.
- 7.3.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
 2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
 3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
 4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК 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 началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.
- 7.3.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.
 - 7.3.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).
 - 7.3.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.
 - 7.3.9 Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 - 7.3.10 Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.
 - 7.3.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:
Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.3.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

7.3.12 Для детектирующих амплификаторов CFX96, Applied Biosystems QuantStudio 5:

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6 соответственно.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II», «ДТлайт» (фасовка S)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (фасовки S, U)

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	00:15	50
4	64 √	00:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °С

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5 (фасовки S, U)

Стадия	№ шага	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	80	01:00	1
	2	94	01:30	1
Стадия ПЦР	1	94	00:20	50
	2	64 √	00:20	

√ – сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включён

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объемом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок¹, герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постаmplификационной контаминации.

2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.4.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых амплификационных пробирок объемом 0,2 мл или микропланшет ПЦР 96 лунок для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки/зарезервировать 4 лунки микропланшета для неизвестных образцов, одну пробирку/лунку для «К-» и одну пробирку/лунку для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 6.

7.4.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.3 Внесите во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.

7.4.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

– 6,0 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,

– 0,3 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К-», «К+».

¹ – для детектирующего амплификатора «ДТлайт» микропланшеты ПЦР 96 лунок не используются

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца, «К-», «К+». Промаркированных пробирок/необходимых лунок микропланшета – 6. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ для 7 (6+1) пробирок/лунок, т.е. 42 мкл ПЦР-буфера + 2,1 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ.

7.4.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.4.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. Неплотно закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.4.8 – 7.4.14.

7.4.8 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.4.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.
- 7.4.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К-», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).
- 7.4.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.4.12 В случае использования микропланшетов ПЦР 96 лунок:
- 7.4.12.1. Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.
- 7.4.12.2. Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
- 7.4.12.3. Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
- 7.4.13 В случае использования пробирок:
Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.4.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в детектирующий амплификатор и проведите ПЦР (7.4.15, 7.4.16).
- 7.4.15 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:
Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см.7.4.14) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.
- 7.4.16 Для детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:
Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6 соответственно.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

Таблица 7 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II», «ДТлайт» (фасовка U)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

7.5 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» в модификациях «ДТпрайм *X*», «ДТпрайм II *X*»)

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 384 лунки, герметизируемые термоплёнкой.
2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

7.5.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.5.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

- 7.5.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ.
- 7.5.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.5.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
 2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с
 3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.5.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ, пробирки или глубоколоночный планшет с препаратами ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.5.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.5.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
- 7.5.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
- 7.5.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.

7.5.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.5.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Setting» необходимо выбрать «Baseline Subtracted Curve Fit».

9.3 Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 8. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 8 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam, (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Hex/Vic, (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Coxiella burnetii</i>
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Coxiella burnetii</i>
Не указан	Не указан	Недостовверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	Указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Указан	Не учитывается	Положительный результат Результаты постановки валидны

9.4 Недостовверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.5 При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.6 При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

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

10.1.2 Фасовка S

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

10.1.3 Фасовка U

10.1.3.1 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Фасовка S

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 Фасовка U

10.2.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °C до минус 18 °C 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 полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °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, 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 применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействия солнечного света
	Нестерильно

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

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

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 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:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г.о. Серпухов, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, 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

Приложение А

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов Coxiella burnetii
в фасовке S**

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объём реакционной смеси – 35 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Coxiella burnetii</i>	ВК	-	-	-

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение Б

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов Coxiella burnetii
в фасовке U**

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объем реакционной смеси – 18 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Coxiella burnetii</i>	ВК	–	–	–

¹ – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение В**Сокращённая методика выделения нуклеиновых кислот
из исследуемого материала (мазки из носоглотки, ротоглотки)
с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС****ВНИМАНИЕ!**

1. Перед началом работы необходимо:
 - включить термостат для прогрева до 65 °С;
 - достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка необходимо прогреть флакон с лизирующим раствором на термостате, предварительно прогревом до 65 °С, до полного растворения осадка. Затем следует перемешать раствор переворачиванием флакона вверх дном 5–10 раз, избегая пенообразования. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение приблизительно 12 часов.
2. При прогревании пробирок с образцами возможно открывание крышек! Следует использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).
 1. Промаркируйте одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл для отрицательного контрольного образца (К-).
 2. Добавьте в каждую промаркированную пробирку с подготовленным для исследования материалом в объёме 100 мкл (см. 6.5) и в пробирку, промаркированную «К-», по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
 3. Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца.
 4. Плотно закройте пробирки, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 5. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
 6. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 7. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 8. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 10 мин.
 9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
 10. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, плотно закройте пробирки и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.

11. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
13. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, плотно закройте пробирки и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
14. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 – 16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 1 мин.
15. Не задевая осадок, удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объёмом не более 20–30 мкл.
16. Откройте пробирки и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
17. Добавьте к осадку соответствующее количество буфера для растворения согласно инструкции по применению комплекта реагентов ПРОБА-НК или ПРОБА-НК-ПЛЮС и осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
18. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
19. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12000–16000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с.

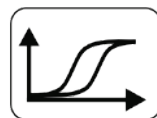
Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С не более одного месяца или при температуре от минус 72 °С до минус 68 °С не более одного года.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, затем встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.



637-3 2024-04-22



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

SARS-CoV-2/Грипп Комплекс

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2021/15157 от 20 августа 2021 года

ВНИМАНИЕ! 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	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
3.1	Аналитическая специфичность	7
3.2	Интерферирующие вещества	7
3.3	Предел обнаружения	8
3.4	Диагностические характеристики.....	9
3.5	Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость.....	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	13
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1	Материал для исследования	15
6.2	Особенности взятия биоматериала	15
6.3	Транспортирование и хранение исследуемого материала	15
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	16
7.1	Выделение РНК	16
7.2	Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции	18
7.3	Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием дозирующего устройства ДТстрим	21
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	22
9	УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	22
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	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

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
ИВ	- 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 РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (SARS-CoV-2/Грипп Комплекс), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) 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* (выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) в биологическом материале человека).

1.4 Показания к проведению исследования:

- наличие симптомов ОРВИ;
- контакт с заболевшими COVID-19 или гриппом, независимо от их возраста;
- пребывание в очагах инфекции (с целью раннего выявления возможного инфицирования и предотвращения дальнейшего распространения).

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, 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 клинико-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-P440-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R3-P440-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	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

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 96 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов. Рекомендуется проводить не более 12 постановок.

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 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 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 полимеразной цепной реакции.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (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, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК вирусов гриппа А (Influenza A virus), включена флуоресцентная метка Fam.

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

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК вирусов гриппа В (Influenza B virus), включена флуоресцентная метка Cy5.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта внутреннего контрольного образца, включена флуоресцентная метка Hex.

В Таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red
Influenza A virus	РНК-ВК	Коронавирус SARS-CoV-2, гены E, N	Influenza B virus

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

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2,5 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 HKU-1, Human Coronavirus NL-63, Human Coronavirus 229E, Human Coronavirus OC-43, Human Rhinovirus, Human Respiratory syncytial virus A, B, Human Parainfluenza virus type 1, Human Parainfluenza virus type 2, Human Parainfluenza virus type 3, Human Parainfluenza virus type 4, Human Metapneumovirus, MERS-CoV, ДНК Human Adenovirus, Mycoplasma pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Chlamydomphila pneumoniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, MRSA, Legionella pneumophila, а также ДНК человека в концентрации до 10^8 копий/мл образца.

Показано наличие специфических результатов амплификации при наличии в образце РНК, выделенной из четырёх образцов SARS-CoV-2, полученных в рамках международной системы QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания, а также РНК, выделенной из 15 штаммов гриппа А разных субтипов и 11 штаммов гриппа В.

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 наборов/комплектов 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 50 мкл)	(объем полученного препарата 100 мкл)
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды	1000 копий/мл образца	1000 копий/мл образца	1000 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 ₃ PO 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

Диагностическая чувствительность и специфичность установлены для каждого вируса возбудителя ОРВИ, РНК которого выявляется при помощи набора реагентов.

Количество исследований (n) – 263.

Диагностические характеристики	Вирусы возбудители ОРВИ, РНК которых выявляется набором реагентов		
	Коронавирус SARS-CoV-2	Вирус гриппа А (Influenza A virus)	Вирус гриппа В (Influenza B virus)
Диагностическая чувствительность (95% ДИ)	100% (96,55–100%)	100% (96,15–100%)	100% (95,94–100%)
Диагностическая специфичность (95% ДИ)	100% (97,69–100%)	100% (97,84–100%)	100% (97,90–100%)

3.5 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Оценка внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости набора реагентов проведена путём сравнения результатов, полученных при исследовании одних и тех же 48 образцов мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата и мокроты.

Результат	Воспроизводимость			
	Внутрисерийная		Межсерийная	Межсерийная, эквивалентность фасовок
	Фасовка S, стрипы		Фасовка S, стрипы	Фасовка S, пробирки
	Набор реагентов 1	Набор реагентов 2		
Количество положительных результатов	42	42	42	42
Количество отрицательных результатов	6	6	6	6
Общее количество совпадений результатов	48 из 48			
% совпадения результатов (95% ДИ)	100% (92,59–100%)			

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

Согласно 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 групп 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 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». 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 СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, 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–III 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, 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 специальный контейнер, 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.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки и ОТ-ПЦР, образующиеся в клиничко-диагностических лабораториях, относятся к классу В и 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» и МУ 1.3.2569-09.

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Опасный компонент	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–
ОТ-ПЦР-буфер	Нет опасных веществ	–
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 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.

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** 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/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, например, ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)	да	да
детектирующий амплификатор роторного типа, например, Rotor-Gene Q (QIAGEN)	да	нет
микроцентрифуга-вортекс	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	нет	да
холодильник с морозильной камерой	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем 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, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да
пробирки микроцентрифужные объемом 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
дозирующее устройство ДТстрим *М1 (только для автоматизированного дозирования)	нет	да
Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения НК:		
бокс биологической безопасности II–III 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 объемом 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 объемом 1,5 мл, с RCF(g) не ниже 16000	да	
микроцентрифуга-вортекс	да	
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 0,2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S, пробирки	Фасовка S, стрипы
физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;	да	
транспортная среда	да	
<p>– набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала (рекомендуется «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» в комплектации ПРОБА-НК, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867</p> <p>или</p> <p>– «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</p> <p>или</p> <p>– «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</p>	да	

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	Транспортирование	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)				

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 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 реагентов.

ВНИМАНИЕ! Объем полученного препарата РНК должен составлять не более 50 мкл.

В случае применения для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-НК-S возможно увеличение объема 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 – Наборы реагентов, валидированные для выделения РНК для дальнейшего исследования набором реагентов SARS-CoV-2/Грипп 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	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота
	ПРОБА-НК (укороченная 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

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

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/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 используются.

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 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 смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», 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 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 0,5 x (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-буфера и фермента 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! Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок/стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. 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 в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

7.2.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблицах 4, 5.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», ДТ-96

№ блока	Температура, °C	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

Таблица 5 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

№ / Cycling	Температура, °C / Temperature	Время / Hold Time, sec	Количество циклов / Cycle Repeats
Cycling	32 deg	1200	1 time
Cycling 2	95 deg	300	1 time
Cycling 3	94 deg	10	50 times
	60 deg √	15	

√ – режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (Fam), Yellow (Hex), Orange (Rox) и Red (Cy5) при 60 °C

Примечания:

1. Продукты амплификации можно хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в течение одного месяца или при температуре минус 20 °C в течение 12 месяцев.
2. Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объём реакционной смеси и т.п.) в приборах серии ДТ, можно загрузить в виде готового файла.

Для удобства работы при первом проведении ОТ-ПЦР загрузите установочный файл «SARS_Influ» для работы с набором реагентов SARS-CoV-2/Грипп Комплекс.

При последующих постановках добавьте в протокол тест «SARS_Influ», 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.

Файл SARS_Influ можно скачать с сайта компании www.dna-technology.ru.

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

7.3 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы»)

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

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

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

7.3.2 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.

7.3.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT. Следуйте указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, или смешайте в отдельной пробирке:

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

где N – количество исследуемых образцов с учетом «К-» и «К+».

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.

7.3.4 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.

7.3.5 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.

7.3.6 Установите пробирки: со смесью «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT», с исследуемыми образцами и контрольными образцами, а также стрипы со смесью для амплификации на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.7 Закройте крышки стрипов.

7.3.8 Центрифугируйте стрипы в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе или на центрифуге для микропланшет 96 лунок при RCF(g) 500 в течение 30 с.

7.3.9 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведенной в таблице 4 (см. 7.2.11).

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 РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт результатов осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицами 7,8.

9.2 Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов (таблица 6).

Т а б л и ц а 6 – Интерпретация результатов исследования контрольных образцов

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Положительный контрольный образец				
Ср/Ct указан	Ср/Ct не указан	Ср/Ct указан	Ср/Ct указан	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец				
Ср/Ct не указан	Ср/Ct указан	Ср/Ct не указан	Ср/Ct не указан	Результат отрицательный 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/Green, Rox/Orange или Cy5/Red) (таблицы 7, 8).

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/Yellow (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост флуоресценции по каналам Fam/Green, Rox/Orange и Cy5/Red отсутствует.

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

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 7 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Анализируемые образцы				
Ср/Ct указан	Не учитывается	Ср/Ct не указан	Ср/Ct не указан	Обнаружена РНК Influenza A virus
Ср/Ct не указан	Не учитывается	Ср/Ct указан	Ср/Ct не указан	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
Ср/Ct не указан	Не учитывается	Ср/Ct не указан	Ср/Ct указан	Обнаружена РНК Influenza B virus
Ср/Ct не указан	Ср/Ct указан	Ср/Ct не указан	Ср/Ct не указан	Не обнаружена РНК выявляемых вирусов
Ср/Ct не указан	Ср/Ct не указан	Ср/Ct не указан	Ср/Ct не указан	Недостовверный результат. Требуется либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно)

Таблица 8 – Другие возможные результаты ПЦР

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Анализируемые образцы				
Ср/Ct указан	Не учитывается	Ср/Ct указан	Ср/Ct не указан	Обнаружена РНК Influenza A virus, обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
Ср/Ct не указан	Не учитывается	Ср/Ct указан	Ср/Ct указан	Обнаружена РНК Influenza B virus, обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
Ср/Ct указан	Не учитывается	Ср/Ct не указан	Ср/Ct указан	Обнаружена РНК Influenza A virus, обнаружена РНК Influenza B virus
Ср/Ct указан	Не учитывается	Ср/Ct указан	Ср/Ct указан	Обнаружена РНК Influenza A virus, обнаружена РНК Influenza B virus, обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2

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

9.8 При наличии положительного результата (экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam/Green, Rox/Orange или Cy5/Red) 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.

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.

Если для биологического образца регистрируется рост уровня флуоресценции для специфического продукта ранее 25 цикла по С_p (С_p менее 25 или С_t менее 22), 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. Вопрос микст-инфицирования изучен недостаточно, исходя из небольшого количества опубликованных литературных данных, совместное инфицирование 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, соответствующей условиям хранения компонентов набора, в течение всего срока годности.

10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри термоконтейнера 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 Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, ОТ-ПЦР-буфер, внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" 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. 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:

- пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, ОТ-ПЦР-буфер, внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" 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. 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, относятся к классу А и 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 in vitro		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		Одноразовое использование

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. 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 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 являлись 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»), Россия.

Адрес производителя:

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

Место производства:

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов SARS-CoV-2/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

Приложение А

**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/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.



886-1 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 Скрин

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2023/19859 от 22 марта 2023 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	13
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	15
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	17
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	22
9	УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	22
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	29

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
ИВ	- 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 ПРЕНАНАНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1** Полное наименование набора: Набор реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОРВИ Скрин), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Назначение: Набор реагентов предназначен для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа 1, 2, 3, 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 медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов.
- 1.6** Область применения: Набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений.
- 1.7** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-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-P451-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	2 пробирки	по 1,5 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 полимеразной цепной реакции (ПЦР).

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

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

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

В смесь для амплификации пробирки № 2 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 Скрин 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	Human parainfluenza virus type 2	БК ¹	–	Human coronavirus 229E	Голубая
2	Human bocavirus	БК	Маркер	Human rhinovirus	Бесцветная
3	Human respiratory syncytial virus	БК	–	Human coronavirus HKU1	
4	Human adenovirus	БК	–	Human coronavirus NL63	
5	Human coronavirus OC43	БК	–	Human parainfluenza virus type 3	
6	Human parainfluenza virus type 4	БК	–	–	
7	Human parainfluenza virus type 1	БК	–	–	
8	Human metapneumovirus	БК	–	–	

¹ – внутренний контрольный образец РНК-БК "А"

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

В образцах биологического материала, не содержащих нуклеиновые кислоты выявляемого вируса - 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 SARS-CoV-2 (исследуемых в рамках международной системы QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания), вирусов гриппа В, вирусов гриппа А разных субтипов (включая (H1N1)pdm09, H3N2), *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Candida spp.*, *Chlamydomyces 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, в том числе исследуемых в рамках международной системы QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания): респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа 1, 2, 3, 4 типов, риновирус, метапневмовирус, коронавирусы HKU1, NL63, OC43, 229E, аденовирус, 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

Предел обнаружения составляет 20 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку. 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.

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

Предел обнаружения 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:

Биоматериал/комплект для выделения НК	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС	ПРОБА-НК-S	ПРОБА-МЧ-НК-S, ПРОБА-МЧ DWP
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды;	4x10 ³ коп/мл образца	4x10 ³ коп/мл образца	8x10 ³ коп/мл образца
Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	4x10 ³ коп/мл образца	Не применяется	Не применяется
Мокрота (предобработка с муколизинном)	2x10 ⁴ коп/мл образца	Не применяется	Не применяется

3.4 Диагностические характеристики набора реагентов

Вид биоматериала	Исследованные образцов, шт.	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Мазок из носоглотки, ротоглотки	114	100% (95,94-100)	100% (86,28-100)
Бронхоальвеолярный лаваж, Эндотрахеальный аспират, Назофарингеальный аспират	84	100% (93,94-100)	100% (86,28-100)
Мокрота	87	100% (93,84-100)	100% (88,06-100)
Итого	285	100% (98,23-100)	100% (95,44-100)

3.5 Воспроизводимость набора реагентов

Внутрисерийная воспроизводимость – 100% (95% доверительный интервал 84,56%–100%).

Межсерийная воспроизводимость – 100% (95% доверительный интервал 84,56%–100%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов 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 санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, 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.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

Выделение НК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к 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
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 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, 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.

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** 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 «ДТпрайм» (РУ № ФСР 2011/10229), «ДТлайт» (РУ № ФСР 2011/10228), ДТ-96 (РУ № ФСР 2007/01250) ООО «НПО ДНК-Технология» или амплификатор детектирующий CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399) (Bio-Rad Laboratories);
- 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 класса;
- центрифуга для микропробирок, с RCF (g) не ниже 12 000;
- 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;
- магнитный штатив, например, НПК «Синтол» или «Promega» (при использовании наборов для выделения нуклеиновых кислот на основе магнитных частиц);
- физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;
- транспортная среда;
- Комплект/набор реагентов для выделения НК из биологического материала (рекомендуется «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» в комплектации ПРОБА-НК или ПРОБА-НК-ПЛЮС 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;
- для предобработки мокроты муколизином:
 - муколизин.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазок из носоглотки, 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 выделении 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 образцов биоматериала

6.3.1 Мазки из носоглотки

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения в зависимости от источника биологического материала согласно установленной процедуре (например, Зонд медицинский одноразовый стерильный РУ № РЗН 2021/13989).

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

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения в зависимости от источника биологического материала согласно установленной процедуре (например, Зонд медицинский одноразовый стерильный РУ № РЗН 2021/13989).

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 1,0 мл образца в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл. Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте ее.

Примечание – Процедура предобработки мокроты муколизинном, 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 2)).

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

6.4.1 Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота

Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокроту допускается хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 48 часов;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.2 Мазок из носоглотки, ротоглотки

Условия транспортирования и хранения мазков из носоглотки, ротоглотки определяются инструкциями к рекомендуемым транспортным средам и комплектам/наборам реагентов для выделения НК.

Дальнейшая обработка указанных выше видов биологического материала осуществляется согласно инструкциям к используемым комплектам/наборам реагентов для выделения НК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! Диапазон вирусной нагрузки для различных возбудителей ОРВИ 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 Скрин

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, ПРОБА-НК-ПЛЮС	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират
	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС (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

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

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**.

Примечания:

1. 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 реагентов ОРВИ Скрин.
2. Процедура предобработки мокроты муколизинем 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 2))

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 Скрин**.

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 (К+) и отрицательного контрольного образца (К-).

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. 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 «K+» и «K-».

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 тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты НК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром. Закрывать 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 «K+», по 10 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирки стрипа, промаркированного «K-», 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 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 3, 4.

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	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

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad Laboratories)

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	35	20:00	1
2	95	5:00	1
3	94	0:15	50
4	64 √	0:20	

√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam, Hex и Cy5 при 64 °С

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 удобства работы при первом проведении ОТ-ПЦР загрузите готовый файл с параметрами теста.
3. 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 РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad Laboratories) следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression).

9.3 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	Cy5	
Положительный контрольный образец			
Ср/Сq указан (в пробирках № 1-8)	Не учитывается	Ср/Сq указан (в пробирках № 1-5)	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец			
Ср/Сq не указан	Ср/Сq указан	Ср/Сq не указан	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

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

9.5 Интерпретация результатов осуществляется в соответствии с таблицей 6. Необходимо учитывать возможность присутствия в образце нуклеиновых кислот нескольких вирусов-возбудителей ОРВИ, в том числе выявляемых в одной амплификационной пробирке.

9.6 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 и Cy5).

- 9.7** Результат оценивается программой как недостоверный (нд) в случае отсутствия в амплификационной пробирке положительных результатов по всем каналам. 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).
- 9.8** При отсутствии положительного результата (по каналам Fam и Cy5) в положительном контрольном образце результаты всей постановочной серии бракуют.
- 9.9** При наличии положительного результата (по каналам Fam 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.

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.

Если для биологического образца регистрируется рост уровня флуоресценции для специфического продукта ранее 25 цикла по Cp/Cq, 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.

Таблица 6 – Интерпретация результатов исследования анализируемых образцов

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

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

10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25°С внутри контейнера 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** Изделия, 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 применения 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
	Предел температуры		Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов		Изготовитель
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Не допускать воздействия солнечного света
	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 *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. 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:

ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ОРВИ Скрин, 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

**Сокращенная методика выделения РНК/ДНК
из исследуемого материала (мазок из носоглотки, 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 Скрин.
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 12 000 – 16 000 x g 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 12 000 – 16 000 x g 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 12 000 – 16 000 x g 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 12 000 – 16 000 x g 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 НК следует сразу же поместить в морозильную камеру и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток, не размораживая до постановки.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот

ПРОБА-НК-S

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2020/11296 от 10 июля 2020 года

ВНИМАНИЕ! 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 выделения нуклеиновых кислот.	5
2.5	Интерферирующие вещества	5
2.6	Минимальное количество биоматериала, из которого могут быть выделены нуклеиновые кислоты	5
2.7	Аналитическая чувствительность набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот	6
2.8	Медицинские изделия, для которых предназначен набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот.	6
2.9	Эффективность набора реагентов	6
2.10	Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость.....	6
3	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
4	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	9
5	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	10
5.1	Материал для исследования	10
5.2	Взятие материала на исследование.....	10
5.3	Транспортирование и хранение исследуемых образцов.....	10
6	ПРОВЕДЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ НК	11
7	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	14
7.1	Транспортирование	14
7.2	Хранение.....	14
7.3	Указания по эксплуатации.....	14
8	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	15
9	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	15
10	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	15
11	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	15
12	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	16
13	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	17

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К-	- отрицательный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота

1 ПРЕНАНАНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1** Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК-S), далее по тексту набор реагентов.
- 1.2** Назначение: Набор реагентов предназначен для выделения нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций, включая коронавирус SARS-CoV-2, из биологического материала человека (мазок из носоглотки, ротоглотки) для последующего анализа методом ПЦР/ОТ-ПЦР.
- 1.3** Функциональное назначение: вспомогательное средство для диагностики *in vitro*.
- 1.4** Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.5** Область применения: Набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений.
- 1.6** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 1.7** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов включает следующие компоненты:

REF P-007-N/1, фасовка N			
Компоненты набора реагентов	Внешний вид	Количество флаконов	Номинальный объем
Лизирующий раствор	Слегка пенящаяся прозрачная бесцветная или светло-голубая жидкость	1 флакон	30 мл
Реагент для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	40 мл
Промывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	50 мл
Буфер для растворения	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	5,0 мл

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 выделение нуклеиновых кислот из 100 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Принцип действия основан на высвобождении нуклеиновых кислот под действием хаотропного агента (гуанидина тиоционата), с последующим осаждением и очисткой от примесей.

2.4 Время проведения выделения нуклеиновых кислот: **от 25 минут**. Время выделения зависит от количества образцов в постановке.

2.5 Интерферирующие вещества

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, которые могут присутствовать в образцах биоматериала и которые не оказывают влияния на исследование методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции: цельная кровь - 5% v/v, хлоргексидин (водный раствор 0,05%) – 10% v/v, ксилометазолина гидрохлорид 0,1% - 10% v/v.

2.6 Минимальное количество биоматериала, из которого могут быть выделены нуклеиновые кислоты: 100 мкл.

2.7 Аналитическая чувствительность набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот (указана в соответствии с п.5(5) Приказа 11н Минздрава России от 19.01.2017):

- в комплексе с набором реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV): не более 500 копий на 1 мл образца биоматериала (мазки из носоглотки и ротоглотки, взятые в транспортную среду).

2.8 Медицинские изделия, для которых предназначен набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК-S может быть использован совместно с медицинскими изделиями, предназначенными для анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР/ОТ-ПЦР.

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК-S валидирован со следующими наборами реагентов, предназначенными для анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР/ОТ-ПЦР:

- Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9948;

- Набор реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОРВИ Комплекс), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17008.

2.9 Эффективность набора реагентов

Количество исследований (N) – 140.

Эффективность медицинского изделия составила:

при выделении ДНК – 100% (Рист. = 96,94%);

при выделении РНК - 100% (Рист. = 98,22%).

2.10 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость – 100 % (91,96% - 100%).

Межсерийная воспроизводимость - 100 % (91,96% - 100%).

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

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 набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Подготовку и проведение исследования биоматериала с использованием набора реагентов следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Комплект медицинской одежды и средств индивидуальной защиты должны соответствовать характеру выполняемых работ и действующим нормам.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

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

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится выделение НК и постановка ПЦР/ОТ-ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 мин.

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.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки и ПЦР/ОТ-ПЦР, образующиеся в клиничко-диагностических

лабораториях, относятся к классу В и 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» и МУ 1.3.2569-09.

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Опасный компонент	Указание на риски
Лизирующий раствор	Тритон X-100	H302, H313, H318, H411
	Гуанидина тиоцианат	H302, H312, H332, H412
	Тиоглицерол	H302, H312, H315, H319, H332
Реагент для преципитации	Изопропанол	H225, H319, H336
Промывочный раствор	Азид натрия менее 0,1%	является безопасным для конечного пользователя
Буфер для растворения	Нет опасных веществ	-
Расшифровка обозначений: H225 – Легковоспламеняющиеся жидкость и пары; H302 – Вредно при проглатывании; H312 – Вредно при контакте с кожей; H313 – Острая токсичность (кожная); H315 – Вызывает раздражение кожи; H318 – Вызывает серьезные повреждения глаз; H319 – Вызывает раздражение глаз; H332 – Вредно при вдыхании; H336 – Может вызывать сонливость и головокружение; H411 – Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями; H412 – Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.		

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, не глотать. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.

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

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида компонентов, 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.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической (микробиологической) безопасности II класса;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °С;
- центрифуга для микропробирок, с RCF(g) не ниже 16000¹;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой - «ловушкой»;
- одноразовые наконечники без фильтра для аспиратора, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 200 мкл;
- пробирки объёмом 1,5 мл, свободные от РНКаз и ДНКаз (рекомендуются: с защёлкивающимися крышками, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes);
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор;
- транспортная среда для биопроб STOP-Ф (ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2020/9640);
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

¹ - в случае использования совместно с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) допустимо использование центрифуги с RCF(g) не ниже 12000.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

5.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки из носоглотки, ротоглотки.

Ограничение метода – 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.

5.2 Взятие материала на исследование

5.2.1 Мазки из полости носа.

Мазки (слизь) берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Поместите тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) в стерильную одноразовую пробирку, содержащую транспортную среду (например, СТОР-Ф), и тщательно прополощите зонд, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением, прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Пробирку плотно закройте и промаркируйте.

5.2.2 Мазки из ротоглотки.

Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

Поместите тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) в стерильную одноразовую пробирку, содержащую транспортную среду (например, СТОР-Ф), и тщательно прополощите зонд, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением, прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Пробирку плотно закройте и промаркируйте.

5.3 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. Допускается хранить полученный материал при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 3 месяцев.

6 ПРОВЕДЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ НК

ВНИМАНИЕ!

1. В случае выпадения осадка в лизирующем растворе прогрейте флакон при температуре 65 °С до полного растворения осадка.
2. Перемешайте содержимое флакона с промывочным раствором перед использованием интенсивно переворачивая флакон 5-7 раз.
3. Всегда открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа, и закрывайте её после проведения манипуляций. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.
4. При проведении центрифугирования располагайте пробирки в центрифуге всегда в одной ориентации для удобства визуализации осадка.
5. Удаление надосадочной жидкости после центрифугирования проводите, постепенно погружая наконечник в жидкость (т.е. опуская его по мере удаления жидкости). Во избежание потери части осадка с НК необходимо отбирать надосадочную жидкость, прислоняя наконечник к противоположной от образования осадка стенке пробирки.
6. При использовании твердотельного термостата с прижимной крышкой во время инкубации пробирок крышка термостата должны быть открыта во избежание перегрева пробирок и их самопроизвольного открывания при извлечении пробирок из термостата.
7. При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) центрифугирование биоматериала в транспортной среде СТОР-Ф перед выделением НК не требуется.

6.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).

ВНИМАНИЕ! При использовании совместно с наборами реагентов для анализа нуклеиновых кислот методом ОТ-ПЦР/ПЦР, для которых предусмотрено использование внутреннего контрольного образца, на данном этапе его следует внести в пробирки (в количестве согласно инструкциям к соответствующим наборам реагентов).

В случае использования совместно с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), в состав которых входит внутренний контрольный образец РНК-ВК "А", внесите в каждую пробирку по 10 мкл предварительно перемешанного на микроцентрифуге-вортексе внутреннего контрольного образца РНК-ВК "А".

- 6.2** Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.
- 6.3** Внесите в каждую пробирку по 100 мкл исследуемого образца, открывая крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывая её перед внесением следующего. В пробирку «К-» исследуемые образцы не вносятся.
- 6.4** Внесите 100 мкл транспортной среды для образцов (например, СТОР-Ф) или физиологического раствора стерильного в пробирку для отрицательного контрольного образца (К-).
- 6.5** Плотно закройте крышки пробирок, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
- 6.6** Инкубируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
- 6.7** Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 6.8** Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, открывая крышку только той пробирки, с которой идёт работа, и закрывая её после добавления реагента.
- 6.9** Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
- 6.10** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000² - 16000 в течение 5 мин.
- ВНИМАНИЕ!** Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.
- 6.11** Не задевая осадок, удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.12** Добавьте в каждую пробирку по 500 мкл промывочного раствора, открывая крышку только той пробирки, с которой идёт работа, и закрывая её после добавления раствора.

ВНИМАНИЕ! Промывочный раствор имеет плотную консистенцию. Не допускается при взятии промывочного раствора резко отпускать поршень дозатора.

² в случае использования совместно с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

- 6.13** Переверните пробирки вверх-вниз 3-5 раз, оmyвая стенки и крышку пробирки. При нахождении пробирок в положении «вверх дном» аккуратно встряхните их для перетекания промывочного раствора из конуса пробирки (нижняя часть пробирки с НК, визуальнo - осадком). Не добивайтесь полного перетекания жидкости. Допустимо, чтобы в конусе оставалась жидкость, поскольку переворачивание пробирки производится для удаления остатков предыдущего раствора со стенок и крышки пробирки. Если осадок отошел от стенки/дна пробирки, необходимо проследить, чтобы перед следующим этапом он находился в жидкости.
- 6.14** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000³ - 16000 в течение 1 мин.
- 6.15** Не задевая осадок, удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
Стремитесь к максимально полному удалению жидкости, при этом не задевая осадок. На данном этапе возможно расположение осадка как на задней стенке пробирки, так и на дне.
- 6.16** Добавьте в каждую пробирку по 50 мкл буфера для растворения. Открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа, и закрывайте её после добавления буфера для растворения.
- 6.17** Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 6.18** Инкубируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
- 6.19** Тщательно встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 5-7 с для равномерного распределения нуклеиновых кислот (визуально – осадка) в жидкости.

Примечание – В зависимости от особенностей биоматериала возможно неполное растворение осадка, что не влияет на качество полученного препарата НК.

- 6.20** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000³- 16000 в течение 30 с.

Препарат НК готов для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР.

Выделенный препарат НК следует хранить в морозильной камере при температуре не выше минус 20 °С не более 1 месяца или при температуре не выше минус 68 °С не более одного года.

Допускается хранить выделенный препарат РНК до постановки ОТ-ПЦР при температуре от 2 °С до 8 °С не более 2 часов, выделенный препарат ДНК до постановки ПЦР при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 суток.

³ в случае использования совместно с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

7.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов, в течение всего срока годности или в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

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

7.2 Хранение

7.2.1 Набор реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

7.2.2 При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе.

7.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

7.3 Указания по эксплуатации

7.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

7.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

7.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

7.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 8.1** 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.
- 8.2** 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.

9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

10 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

11 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 <i>n</i> тестов		Изготовитель
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		Не допускать воздействия солнечного света

12 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

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.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ПРОБА-НК-S, 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 619-2

2023-03-08



497-1 2021-07-19



ИНСТРУКЦИЯ

по применению транспортной среды для биопроб с муколитиком

СТОП-М

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2019/9453 от 24 декабря 2019 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ	3
2	ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНОЙ СРЕДЫ	4
2.1	Состав транспортной среды СТОП-М	4
2.2	Описание и принцип метода.....	4
2.3	Число анализируемых проб.....	4
2.4	Время подготовки к выделению ДНК.....	4
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	7
6.1	Соскобы/мазки эпителиальных клеток	7
6.2	Транспортирование и хранение исследуемого материала.....	7
7	ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ БИОМАТЕРИАЛА ПЕРЕД ВЫДЕЛЕНИЕМ ДНК.....	8
7.1	Общие рекомендации	8
7.2	Подготовка к выделению ДНК	8
8	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	9
8.1	Транспортирование	9
8.2	Хранение	9
8.3	Указания по эксплуатации	9
9	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	10
10	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	10
11	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	10
12	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ	10
13	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	11
14	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	12

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на транспортную среду для биопроб с муколитиком (СТОП-М) по ТУ 21.20.23-102-46482062-2019, далее по тексту транспортная среда СТОП-М.
- 1.2** Транспортная среда СТОП-М предназначена для транспортирования и хранения образцов биологического материала человека (соскобы/мазки эпителиальных клеток из урогенитального тракта, ротоглотки, носоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза, кожи), в том числе содержащих примесь слизи, с целью последующего анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 1.3** Функциональное назначение изделия: Изделие является вспомогательным средством в клинической лабораторной диагностике и предназначено для транспортирования и хранения образцов биологического материала с целью последующего анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 1.4** Транспортная среда СТОП-М может быть использована в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.5** Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.6** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 1.7** Применять изделие строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНОЙ СРЕДЫ

2.1 Состав транспортной среды СТОП-М

REF P-910-1/1, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Транспортная среда	Прозрачная бесцветная жидкость	100 пробирок	по 500 мкл

2.2 Описание и принцип метода

Транспортная среда СТОП-М представляет собой готовый к применению водно-солевой прозрачный, бесцветный раствор с добавлением консерванта, муколитика и ароматизатора. Консервант препятствует размножению неспецифических микроорганизмов, а муколитик воздействует на дисульфидные связи мукополисахаридов, тем самым разжижая слизь.

2.3 Число анализируемых проб

Транспортная среда СТОП-М предназначена для одноразового применения и рассчитана на 100 образцов.

2.4 Время подготовки к выделению ДНК

От 15 минут. Время подготовки к выделению ДНК зависит от количества образцов в постановке.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сохранность ДНК в образцах биоматериала при разных режимах хранения

Виды биоматериала	Сохранность ДНК (%)	
	28 дней при температуре от 18 °С до 25 °С	3 месяца при температуре от 2 °С до 8 °С
Соскоб эпителиальных клеток из урогенитального тракта	76,7	67,5
Соскоб эпителиальных клеток из ротоглотки	79,6	68,6
Соскоб эпителиальных клеток из носа	64,9	67,6
Соскоб с конъюнктивы глаза	64,3	51,6
Соскоб эпителиальных клеток из прямой кишки	86,4	93,1
Соскоб эпителиальных клеток с кожи	83,6	67,1
Всего (среднее значение, 95% ДИ)	75,9 (67,8-85,2) n=50	69,2 (57,8-79,4) n=50

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Взятие биоматериала в транспортную среду СТОП-М должно проводиться в процедурных кабинетах, оборудованных в соответствии с требованиями, изложенными в разделе 1 СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».

Подготовка к выделению ДНК и выделение ДНК из образцов биологического материала должны проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением 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», и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К проведению исследования с использованием транспортной среды СТОП-М допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

Подготовку и проведение исследования с использованием транспортной среды СТОП-М следует проводить в боксах биологической безопасности II класса биологической защиты.

Дозаторы, используемые при работе с транспортной средой СТОП-М, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

При использовании набора в клинко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Опасные компоненты в транспортной среде СТОП-М

Компонент изделия	СТОП-М
Транспортная среда	Азид натрия менее 0,1%

В состав транспортной среды входит **азид натрия** – консервант, в концентрации менее 0,1 %, что является безопасным для конечного пользователя (указание на риски: H210¹).

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен.

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.

Не использовать транспортную среду СТОП-М:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов указанному в паспорте к транспортной среде СТОП-М;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов;
- по истечению срока годности набора.

Примечание - Транспортная среда СТОП-М **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, 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 транспортной средой СТОП-М требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса биологической защиты;
- микроцентрифуга-вортекс;
- центрифуга с RCF не ниже 13 000 x g;
- холодильник с морозильной камерой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости от 100 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- одноразовые стерильные зонды, тампоны, цитощетки для взятия биоматериала;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект/набор реагентов для выделения ДНК.

¹ - H210- Лист данных о безопасности доступен по запросу.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Соскобы/мазки эпителиальных клеток

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься биологический материал, и закрывать ее перед работой со следующей пробиркой.

6.1.1 Перенесите соскоб/мазок эпителиальных клеток из урогенитального тракта, ротоглотки, носоглотки, прямой кишки, с конъюнктивы глаза, кожи с помощью одноразового стерильного зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой СТОП-М, тщательно и аккуратно ополосните зонд, избегая разбрызгивания жидкости.

6.1.2 Извлеките зонд, прижимая его к стенке пробирки, и удалите избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируйте.

Примечание – Перед получением соскоба эпителиальных клеток свободно стекающее отделяемое необходимо удалить стерильным ватным тампоном. При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

6.2.1 Транспортировать и хранить пробирки с образцами биологического материала, помещенными в транспортную среду СТОП-М, до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3-х месяцев.

6.2.2 Допускается транспортирование и хранение пробирок с образцами биологического материала, помещенными в транспортную среду СТОП-М, при температуре от 18 °С до 25 °С не более 28 суток.

7 ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ БИОМАТЕРИАЛА ПЕРЕД ВЫДЕЛЕНИЕМ ДНК

7.1 Общие рекомендации

- 7.1.1 Используйте одноразовые наконечники с аэрозольным барьером, свободные от РНКаз и ДНКаз.
- 7.1.2 При добавлении раствора в пробу, содержащую биологический материал, аккуратно вносите жидкости, не касаясь стенок пробирок. При касании к стенке пробирки смените наконечник. Наконечник следует менять при каждом удалении раствора из образца.
- 7.1.3 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будет вноситься образец/реактив или удаляться надосадочная жидкость, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

7.2 Подготовка к выделению ДНК

- 7.2.1 Центрифугируйте пробирку с биоматериалом в транспортной среде СТОП-М при 13 000 x g в течение 10 мин.
- 7.2.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Примечание – При использовании протоколов исследования, не предполагающих предварительного центрифугирования биоматериала, пп. 7.2.1 и 7.2.2 не выполняются.

- 7.2.3 Добавьте к осадку необходимое количество лизирующего раствора из состава применяемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК согласно прилагаемой к данному комплекту/набору инструкции.
- 7.2.4 Произведите выделение ДНК в соответствии с используемым методом.
- 7.2.5 Для формирования отрицательного контрольного образца следует выполнить пп.7.2.1 и 7.2.2 для пробирки с транспортной средой СТОП-М, не содержащей биоматериал, или добавить 100 мкл транспортной среды СТОП-М, не содержащей биоматериала в соответствующую пробирку с лизирующим раствором из состава применяемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК.

Транспортная среда для биопроб с муколитиком (СТОП-М) совместима со всеми методиками для выделения ДНК.

Рекомендуемые наборы для выделения нуклеиновых кислот:

- Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД) по ТУ 9398-015-46482062-2008 (ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), РУ № ФСР 2008/02939 от 15.06.2015 г.;

- Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), РУ № ФСР 2010/08696 от 25.10.2016 г.;
- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, ООО «ДНК-Технология ТС»), РУ № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.;
- Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) по ТУ 9398-088-46482062-2016» (ООО «ДНК-Технология ТС»), РУ № РЗН 2017/5753 от 22.05.2017 г.

8 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

8.1 Транспортирование

- 8.1.1 Транспортирование транспортной среды СТОП-М осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25 °С не более 14 суток.
- 8.1.2 Транспортная среда СТОП-М, транспортированная с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

8.2 Хранение

- 8.2.1 Транспортную среду СТОП-М следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.
- 8.2.2 Транспортная среда СТОП-М, хранившаяся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

8.3 Указания по эксплуатации

- 8.3.1 Транспортная среда СТОП-М должна применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению транспортной среды.
- 8.3.2 После вскрытия упаковки транспортную среду СТОП-М следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.
- 8.3.3 Транспортная среда СТОП-М с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 9.1** При использовании транспортной среды СТОП-М в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 9.2** Транспортная среда СТОП-М, пришедшая в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.
- 9.3** Упаковка транспортной среды СТОП-М (коробки, грипперы) после использования по назначению относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 10.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие транспортной среды СТОП-М требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 10.2** Срок годности транспортной среды СТОП-М - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

11 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Транспортная среда СТОП-М предназначена для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

12 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес производителя
	Годен до		Серия набора
	Дата производства		

13 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, 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 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.

14 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 медицинской 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: ООО «ДНК-Технология ТС», 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.

Рекламации по вопросам качества транспортной среды СТОП-М следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Номер 497-1
2021-07-19



Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08867 от 01 июля 2024 года

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС

Формы комплектации: ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Комплект реагентов ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС предназначен для получения препарата нуклеиновых кислот (НК) из биологического материала (таблица 1) для последующего анализа методом обратной транскрипции (РНК) и/или полимеразной цепной реакции (ДНК).

Комплектация ПРОБА-НК-ПЛЮС предназначена для получения большего объема ДНК (300 мкл) по сравнению с комплектацией ПРОБА-НК (50 мкл) с целью проведения в дальнейшем большего числа ПЦР-исследований.

1.2 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта:

Компонент	Количество			
	ПРОБА-НК-ПЛЮС		ПРОБА-НК	
• Лизирующий раствор	15 мл	1 флакон	30 мл	1 флакон
• Реагент для преципитации	20 мл	1 флакон	40 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №1	25 мл	1 флакон	50 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	15 мл	1 флакон	30 мл	1 флакон
• Буфер для растворения	15 мл	1 флакон	1,25 мл	4 пробирки
• Отрицательный контрольный образец	-	-	1,5 мл	2 пробирки
• Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	-	-	1,0 мл	1 пробирка
• Внутренний контрольный образец (ДНК-ВК)	-	-	1,0 мл	1 пробирка

ВНИМАНИЕ! Буфер для растворения различается для комплектаций ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС. Использовать буфер для растворения из другой комплектации не допускается.

2.2 Количество анализируемых образцов: комплект рассчитан на выделение НК из 50/100 анализируемых образцов, включая отрицательные контрольные образцы.

Т а б л и ц а 1

Комплектация	ПРОБА-НК	ПРОБА-НК-ПЛЮС
Каталожный номер	[REF] P-002/1	[REF] P-002/2
Материал для исследования	Плазма крови, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, мазки и смывы из полости носа и ротоглотки, фекалии, материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы) и др.	Плазма крови, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища и др.
Количество определений	100	50

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов:

- ОТ-ГЕПАТОГЕН-С;
 - ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ (формат «Real-Time»);
 - ВИЧ-ГЕН;
 - ВГБ-ГЕН;
 - набором реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1)
- необходимо использовать только комплектацию ПРОБА-НК.

2.3 Время проведения выделения нуклеиновых кислот – 1 час.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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», 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». Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально опасные.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки, образующиеся в клинико-диагностических лабораториях, относятся к классу В и 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-противоэпидемиологических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09.

Пр и м е ч а н и е - Комплект реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

При работе с комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛУС) требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 25 °С до 98 °С;
- центрифуга для микропробирок, с RCF(g) не ниже 12000;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-«ловушкой»;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб (ООО «НПО ДНК-Технология») и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

При выделении НК из плазмы:

- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия.

При выделении НК из мокроты (способ 1):

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

При выделении НК из мокроты (способ 2): муколизин.

5 ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

5.1 Плазма крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

5.1.1 Центрифугируйте пробирки с кровью при RCF(g) 900 в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

5.1.2 После центрифугирования отберите полуавтоматическим дозатором верхнюю фракцию (плазма) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

ВНИМАНИЕ!

1. Время от момента взятия периферической крови до получения плазмы не должно превышать 6 часов. При необходимости плазму допускается хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 3 месяцев.
2. Перед выделением НК плазму необходимо перемешать!

5.2 Мокрота

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), предобработку мокроты следует проводить с использованием муколизина (способ 2).

5.2.1 Способ 1

5.2.1.1 Примерно 500 мкл биологического материала перенесите в стерильную посуду.

5.2.1.2 Добавьте к пробе мокроты равный объем 10% трёхзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12\text{H}_2\text{O}$, плотно закройте крышкой и интенсивно встряхните.

5.2.1.3 Смесь инкубируйте при температуре 37 °С в течение 18–24 часов, затем нейтрализуйте 1М HCl до pH 6,8–7,4.

5.2.1.4 Центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 20 мин.

5.2.1.5 Слейте надосадочную жидкость в ёмкость с 5% раствором хлорамина для обеззараживания.

5.2.1.6 Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

5.2.1.7 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.2.1.8 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.2.2 Способ 2

5.2.2.1 В контейнер с образцом добавьте муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.

5.2.2.2 Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20–30 мин при комнатной температуре, каждые 2–3 мин встряхивая контейнер.

Обработанную мокроту допускается хранить в контейнере в течение суток при температуре от 2 °С до 8 °С или длительно при температуре не выше минус 16 °С (в случае необходимости повторного выделения РНК/ДНК).

5.3 Соскобы эпителиальных клеток

5.3.1 Перенесите соскоб эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразового стерильного зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного), и тщательно прополощите зонд, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости.

5.3.2 Полностью удалите зонд из пробирки. Пробирку плотно закройте и промаркируйте.

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), в ходе подготовки соскобов из носоглотки и ротоглотки дальнейшее центрифугирование не требуется, образцы готовы для выделения РНК.

5.3.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.3.4 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).
Примечание - Перед взятием соскоба из цервикального канала необходимо удалить слизь стерильным ватным тампоном.

5.4 Моча

5.4.1 Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.4.2 Перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

5.4.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.4.4 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

5.4.5 Добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.4.6 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.4.7 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.5 Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

5.5.1 Слюну, ликвор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.5.2 Перенесите 500 мкл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

5.5.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.5.4 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.5.5 Добавьте к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

5.5.6 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.5.7 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.6 Сперма, секрет предстательной железы

5.6.1 Перенесите 100 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного), встряхните пробирку на вортексе в течение 5-10 с.

5.6.2 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.6.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.7 Молоко

5.7.1 Соберите материал в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.7.2 Аккуратно перемешайте и перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Срок сбора молока не более 24 часов. Хранение в течение всего срока сбора при температуре от 2 °С до 8 °С.

5.8 Мазки и смывы

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), подготовка мазков в транспортной среде и смывов не требуется, образцы готовы для выделения РНК.

5.8.1 Центрифугируйте пробирку, содержащую анализируемый материал, при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.8.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

5.9 Фекалии

5.9.1 Перенесите ~250 мг (мкл) фекалий в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.9.2 Встряхните пробирку на вортексе в течение 5-10 с.

5.9.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 100 в течение 2-3 мин.

5.9.4 Перенесите 800-1000 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.9.5 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

5.10 Внутренние органы животных

5.10.1 Поместите ~250 мг исследуемого материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

5.10.2 Добавьте 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.10.3 Встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 сек, центрифугируйте пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 сек.

5.10.4 Удалите надосадочную жидкость.

Полученный материал готов для выделения НК.

5.11 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. Допускается хранить полученный материал при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 3 месяцев.

6 ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Примечание - В лизирующем растворе допускается выпадение осадка. Перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65 °С в течение 10 мин.

6.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирке объемом 1,5 мл.

Примечание - Для образцов, прошедших предобработку с получением осадка и надосадочной жидкости (см. 5: мокрота - способ 1, слюна, моча, ликвор, сперма, секрет предстательной железы, мазки и смывы; фекалии), маркируются пробирки с подготовленным для исследования материалом в объеме 100 мкл.

6.2 В случае, если предусмотрено использование ВК, внесите во все промаркированные пробирки по 10 мкл предварительно перемешанного внутреннего контрольного образца в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

ВНИМАНИЕ!

1. При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), используется внутренний контрольный образец из соответствующего набора реагентов. Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) и внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) из комплекта реагентов ПРОБА-НК в этом случае не используются.

2. При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HCV, HIV) и ДНК-содержащими вирусами (HBV), необходимо на стадии прободготовтки внести два внутренних контроля (РНК-ВК + ДНК-ВК).

6.3 Внесите в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.

6.4 Внесите по 100 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов (за исключением пробирок с образцами, прошедшими предобработку с получением осадка (6.1), и пробирки «К-»).

6.5 В пробирку, маркированную «К-», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца (комплексация ПРОБА-НК), транспортной среды или физиологического раствора стерильного (комплексация ПРОБА-НК-ПЛЮС). Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3-5 с.

- 6.6** Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 мин, центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 30 с.
- ВНИМАНИЕ!** При выделении РНК вируса гриппа А из тканей внутренних органов животных необходимо термостатировать пробирки при 65 °С в течение 30 мин, осадить конденсат центрифугированием на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и перенести надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 6.7** Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с.
Пр и м е ч а н и е - При выделении НК HCV, HBV и HIV пробирки необходимо встряхнуть на вортексе дважды.
- 6.8** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 15 мин.
- 6.9** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.10** Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки.
- 6.11** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 5 мин.
- 6.12** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.13** Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки.
- 6.14** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 5 мин.
- 6.15** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.16** Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 6.17** Добавьте к осадку 50 мкл (комплектация ПРОБА–НК) или 300 мкл (комплектация ПРОБА–НК–ПЛЮС) буфера для растворения, закройте крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ!

1. Буфер для растворения различается для комплекций ПРОБА–НК и ПРОБА–НК–ПЛЮС. Использовать буфер для растворения из другой комплектации не допускается.
 2. При исследовании клинического материала на наличие инфекций, вызванных только РНК-содержащими вирусами (при работе с наборами ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ВИЧ-ГЕН), рекомендуется растворять осадок в 16,5 мкл буфера для растворения, так как увеличение объема буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.
 3. При работе с набором ВГБ-ГЕН, а также при одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HCV, HIV) и ДНК-содержащими вирусами (HBV), необходимо растворить осадок в 25 мкл буфера для растворения.
- 6.18** Осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 6.19** Прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 мин. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с.

ВНИМАНИЕ! При выделении НК HCV, HBV и HIV пробирки не встряхивать!

- 6.20** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 30 с.
Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции (РНК) или проведения ПЦР (ДНК).

Пр и м е ч а н и я :

1. Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции. Препарат РНК не подлежит хранению.
2. Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца или при температуре от минус 68 °С до минус 72 °С не более одного года.

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С. Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА–НК/ПРОБА–НК–ПЛЮС) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта.

Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

7.3 Указания по эксплуатации

Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

После вскрытия упаковки компоненты комплекта реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты комплекта реагентов следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта.

8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 8.1** При использовании комплекта 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.
- 8.2** Комплекты 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.

9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 9.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 9.2** Срок годности комплекта - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

10 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА–НК/ПРОБА–НК–ПЛЮС), 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.

Адрес производителя:

ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

1) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

2) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.