«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. генерального директора по научно-производственной деятельности федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

_____ Г.А. Шипулин
«__»_____ 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК

из биологического материала

«АмплиТест РИБО-преп»

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
Российская Федерация, 119121,
город Москва, улица Погодинская,
д. 10, стр. 1

IVD

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала 6
Воспроизводимость 7
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 8
РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ 9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК 16
СОСТАВ 17
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 18
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 20
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ 21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 22

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

НК	- нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК/ДНК-мишени (1 копия), содержащаяся в 1 геноме вируса
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контроль экстракции РНК/ДНК
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и ПЦР-амплификация
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК SARS-CoV-2
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп», далее – комплект реагентов «АмплиТест РИБО-преп», предназначен для экстракции (выделения) тотальной РНК/ДНК из биологического материала (мазков со слизистой носо- и ротоглотки, мокроты, фекалий) в целях исследования полученных образцов методом амплификации нуклеиновых кислот.

Показания и противопоказания к применению комплекта реагентов

Комплект реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для экстракции тотальной РНК/ДНК с целью последующего исследования биологического материала методом амплификации нуклеиновых кислот.

Противопоказания к применению - нарушение целостности упаковки, несоответствие внешнего вида реагента описанию, несоблюдение условий транспортирования и хранения согласно инструкции, истекший срок годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с комплектом реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Комплект реагентов используется для экстракции РНК/ДНК из биологического материала, полученного от лиц вне зависимости от популяционной, демографической принадлежности к какой-либо расе или народности.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип действия основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора для лизиса, содержащего хаотропный агент (гуанидина изотиоцианат), с последующим осаждением нуклеиновых кислот изопропанолом в присутствии соосадителя гликогена, и экстракцией их в раствор.

ВАРИАНТЫ ИСПОЛНЕНИЯ

Комплект реагентов выпускается в 2 вариантах исполнения:

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 50 - комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала.

Рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 50 образцов, включая контроли.

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 - комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала.

Рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного комплекта реагентов применимы следующие характеристики:

Специфическая активность

Таблица 1

Наименование показателя	Норма
1. Положительный результат при тестировании стандартного образца предприятия СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV в разведении в 200 раз (что соответствует концентрации 1×10^3 ГЭ/мл образца), а также в концентрации больше указанной.	Определено значение Ct менее граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE
2. ОКО – отрицательный контрольный образец	Определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора FAM. Значение Ct отсутствует по каналу для флуорофора JOE

Примечание. При анализе совместно с набором реагентов «АмплиТест SARS CoV-2» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Р.У. № РЗН 2020/9765).

Эффективность экстракции

Таблица 2

Наименование показателя	Норма
Соотношение концентраций РНК SARS CoV-2 в модельном образце биоматериала прошедшем экстракцию и контрольном образце без экстракции.	Эффективность экстракции не менее 50 %

Примечание. При анализе с помощью системы QX100 droplet digital PCR для проведения капельной цифровой ПЦР (Р.У. № ФСЗ 2012/13278)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Для контроля процесса исследования клинического материала методом амплификации нуклеиновых кислот рекомендуется использовать внутренний контрольный образец (ВКО). Если он предусмотрен в наборе для амплифицикации нуклеиновых кислот, ВКО добавляется в каждый исследуемый и контрольный образец согласно инструкции по применению набора реагентов для проведения амплификации. ВКО проходит все стадии экстракции совместно с анализируемыми образцами. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора для проведения амплификации. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и амплификации.

Непригодными для исследования являются образцы, объем, условия/срок хранения и транспортировки которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные – муцин, гемоглобин, и экзогенные - водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %, «Ибупрофен» (суппозитории ректальные 60 мг), «Эффералган®» (суппозитории ректальные 80 мг) - вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота, фекалии), используемом для исследования.

Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты, испытуемым комплектом реагентов «АмплиТест РИБО-преп» (экстракция РНК) совместно с набором реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2» (проведение реакций ОТ-ПЦР) были протестированы модельные образцы, содержащие и не содержащие эндогенные и экзогенные потенциально интерферирующие вещества. Модельные образцы представляли собой мазки со слизистой носо- и рото-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

глотки, образцы мокроты, фекалий, не содержащие РНК коронавируса SARS-CoV-2, контаминированные разведением СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV до конечной концентрации $1x10^4$ ГЭ/мл, с последующим добавлением эндогенных (муцин, гемоглобин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %, «Ибупрофен» суппозитории 60 мг, «Эффералган®» суппозитории 80 мг) ПИВ в максимально возможной концентрации, и без добавления данных веществ. Вычисляли разницу полученных средних значений Ct ($\Delta Ct_{ср.}$) между контрольными и испытуемыми образцами. При значении $\Delta ct_{ср.}$ менее 1,5 циклов делали вывод об отсутствии влияния потенциально интерферирующих веществ на результат ОТ-ПЦР.

Результаты тестирования представлены в табл. 3.

Таблица 3

Биологический материал	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мокрота, мазки	Эндогенные вещества	Муцин	5%	Не обнаружено
		Гемоглобин	100 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2% (v/v)	Не обнаружено
Фекалии	Эндогенные вещества	Муцин	5%	Не обнаружено
		Гемоглобин	100 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	«Ибупрофен» суппозитории	2% (v/v)	Не обнаружено
		«Эффералган®» суппозитории	2% (v/v)	Не обнаружено

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV с концентрацией $1x10^3$ ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО из набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2». Анализ проводился совместно с набором реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Результаты представлены в табл. 4.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4

Воспроизводимость исследования

Тип образцов	Внутри постановки внутри серии (повторяемость)		Между сериями (повторяемость)		Между лабораториями внутри серии (воспроизводимость)		Итого воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
«АмплиТест РИБО-преп» вариант 50								
Положительные СОП № 6 $1x10^3$ ГЭ/мл	12	100	18	100	36	100	36	100
Отрицательные	12	100	18	100	36	100	36	100
«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100								
Положительные СОП №6 $1x10^3$ ГЭ/мл	12	100	18	100	36	100	36	100
Отрицательные	12	100	18	100	36	100	36	100

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль этапа экстракции НК осуществляется одновременно с оценкой достоверности результатов этапа исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

Контроли экстракции НК

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы (ВКО, ОКО, ПКО), если они предусмотрены для проведения тестирования согласно инструкции к используемому набору реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот:

- внутренний контрольный образец (ВКО) см. раздел «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала»;
- отрицательный контроль (ОКО) для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов и контроля контаминации. В качестве ОКО используют реагент, входящий в состав набора реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- положительный контроль (ПКО), если он предусмотрен для проведения тестирования. В качестве ПКО используют реагент, входящий в состав набора реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Клинические испытания были проведены на основании сопоставления результатов тестирования проб НК, выделенных из одних и тех же образцов биологического материала пять раз (испытуемым комплектом варианта 50 двух серий, варианта 100 двух серий и препаратом сравнения) с последующим ПЦР-анализом[1].

Было протестировано 150 образцов биологического материала (750 проб РНК после проведения процедуры экстракции, без учета контрольных образцов): по 50 зашифрованных клинических образцов каждого вида биологического материала (мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокроты, фекалий), по 35 образцов содержащих и по 15 не содержащих РНК SARS-CoV-2.

Совпадение результатов составило 100 %, однофакторный дисперсионный анализ показал отсутствие значимых различий в результатах определения РНК SARS-CoV-2 полученных после использования испытуемого комплекта реагентов (разных вариантов исполнения и серий) и комплекта сравнения.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся ко II группе патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и

[1] В качестве препарата сравнения, а также для анализа проб биологического материала методом амплификации нуклеиновых кислот использовался набор реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ № РЗН 2014/1987.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13 диагностика возбудителей инфекционных болезней II группы патогенности молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней" (с изменениями на 29 июня 2011 года). Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе необходимо всегда выполнять следующие требования: рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

- Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Комплект реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

- Комплект реагентов готов к применению согласно инструкции. Применять комплект реагентов строго по назначению.

- К работе с комплектом реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- Не использовать комплект реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать комплект реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать комплект реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

- Информационное письмо о безопасности комплекта реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности комплект реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Реагент для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков». (РУ № ФСР 2009/05515, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора или аналогичный).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты.
2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
3. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2»,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).

2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axygen», США).
10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как один образец. Для этого берут мазки разными зондами сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Мазки со слизистой нижнего носового хода.

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Для взятия мазков используют сухие стерильные зонды из полистирола с вискозными тампонами. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5–6 см). После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вискозным тампоном) помещают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Мазки с задней стенки ротоглотки.

Образцы берут сухими стерильными зондами с вискозными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вискозным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют. Допускается хранение материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

Мокрота.

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фекалии.

Образцы забирают в стерильный горшок или подкладное судно. Затем в количестве 1 г (примерно) переносят в одноразовую герметичную емкость из полипропилена. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК

Мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК/ДНК отбирают 100 мкл образца.

Мокрота.

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с мокротой добавляется реагент «МУКОЛИЗИН» в соотношении объемов 2:1 (ориентируясь по градуировке емкости). При необходимости увеличивают объем реагент «МУКОЛИЗИН» до соотношения 5:1. После инкубации при комнатной температуре до просветления мокроты (не более 20 минут) 100 мкл мокроты используют для экстракции РНК/ДНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Предварительная обработка фекалий.

В микроцентрифужную пробирку (объемом 1,5 мл) вносят 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии (10%). Взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Центрифугируют суспензии фекалий 5 мин при 7000 g (10 тыс об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf). Супернатант (осветленный экстракт фекалий) в объеме 20 мкл используют для экстракции РНК/ДНК.

СОСТАВ

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета[2]	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 образцов, включая контроли.

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета[2]	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона

[2] При хранении при температуре от 2 до 8°С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 рассчитан на выделение РНК из 100 образцов, включая контроли.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку **ВКО** (не более 10 мкл), если он предусмотрен для проведения тестирования, согласно инструкции к используемому набору реагентов для амплификации нуклеиновых кислот. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО (если он предусмотрен), внести по 100 мкл подготовленных проб (для экстрактов фекалий внести 20 мкл проб и 80 мкл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора)), используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл фосфатного буфера или стерильного физиологического раствора или **100 мкл ОКО** (если он предусмотрен в комплектации набора для амплификации нуклеиновых кислот). В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **ПКО** (не более **100 мкл),** если он предусмотрен для проведения тестирования в комплектации набора для амплификации нуклеиновых кислот.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65°С** в термостате.

5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**

7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.

8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.

10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.

13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 90 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев[3]. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. Комплект реагентов «АмплиТест РИБО-преп» хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Холодильная камера должна обеспечивать регламентированный температурный режим.

[3] Первоначальный срок годности установлен методом ускоренной оценки стабильности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик комплекта реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество комплекта реагентов направлять по адресу 119121, г. Москва, ул. Погодинская, дом 10, стр.1, e-mail: promlab@cspmz.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению комплекта реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации комплекта реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Руководитель
производственной лаборатории Ж.Е.Тарасова

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии	Σ	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		Беречь от влаги

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru