Организация-производитель
Место производства (2)

СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»
С.А. Самарин
«___» _____ 2022 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»
С.П. Левичев
«___» _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

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)

Место производства (1)
СОГЛАСОВАНО
Генеральный директор
ООО «НПО ДНК-Технология»
В.Ю. Дмитровский
«03» _____ 2022 г.

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-Технология ТС»
САМАРИН С.
ПОДПИСЬ

2022 г.

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

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

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование изделия:** 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 **Демографические и популяционные 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.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R3-P440-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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 объём 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.

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

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 специфичного 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, использующихся для детекции продукта амплификации искомой кДНК вирусов гриппа А (Influenza A virus), включена флуоресцентная метка Fam.

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

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

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

В состав ДНК-зондов, использующихся 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.

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

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

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

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 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, Chlamydophila 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:

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

– эндогенные вещества (цельная кровь; лейкоциты; слизь);

– экзогенные (вещества, добавляемые в образцы биоматериала во время пробоподготовки (изопропиловый спирт и метилацетат); местные лекарственные препараты).

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

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

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

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения: 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку.

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

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

Предел обнаружения 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации РНК в образце при использовании комплектов/наборов 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)
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды;	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
Мокрота (предобработка с Na_3PO_4)	2000 копий/мл образца	Не применяется	Не применяется
Мокрота (предобработка с муколизином)	5000 копий/мл образца	Не применяется	Не применяется

* Информация будет внесена в Инструкцию по применению Набора реагентов SARS-CoV-2/Грипп Комплекс при условии получения регистрационного удостоверения на Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ-НК-S), находящийся в настоящее время на этапе регистрации.

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

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 A (Influenza A virus)	Вирус гриппа B (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 1	Набор 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%)			

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

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

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

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 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, 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 клинико-диагностических лабораториях,

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

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.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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

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

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 объёмом 0,2 мл	нет	да
холодильник с морозильной камерой	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками	да	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
дозирующее устройство ДТстрим *M1 (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 объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;	да	
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора	да	
центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 x g	да	
микроцентрифуга-вортекс	да	
дозаторы механические или электронные одноканальные с перемен-	да	

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

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S, пробирки	Фасовка S, стрипы
ным 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	да	
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	
физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;	да	
транспортная среда	да	
набор/комплект 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 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*	да	

* По причине того, что в настоящее время Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ-НК-S) находится на этапе регистрации, информация о номере регистрационного удостоверения будет внесена при условии его получения.

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

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 транспортирования	Комментарии
Мазок из носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков**	4 °С	≤5 дней: 4 °С >5 дней*: -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*: -70 °С	Возможно небольшое разведение образца
Эндотрахеальный аспират, аспират носоглотки или смыв из носа	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов*: -70 °С	
Мокрота	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов*: -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.

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

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).

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

7.1 Выделение РНК

Для выделения РНК из мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата, мокроты используют комплекты 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.

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*	**ПРОБА-МЧ-НК-S**	Мазки из носоглотки, ротоглотки

* По причине того, что в настоящее время Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ-НК-S) находится на этапе регистрации, информация о номере регистрационного удостоверения будет внесена при условии его получения.

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

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 используют.

Отрицательный контрольный образец

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

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

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

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

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!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (К+) и отрицательного 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-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

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. 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 положительного контрольного образца.

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

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, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	35	20	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	94	0	10	5		Цикл
	64	0	10		√	
4	94	0	5	45		Цикл
	64	0	10		√	
5	80	0	1	1		Цикл
6	10	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

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

Таблица 5 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

№ /Cycling	Температура, °С /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 °С			

Примечания:

1. Продукты амплификации можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца или при температуре минус 20 °С 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 с расширением ini.

Для удобства работы при первом проведении ОТ-ПЦР загрузите файл «SARS_Influ.ini» 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 положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ОТ-ПЦР.

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

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!

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

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

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

- 15 х (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 0,5 х (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 500 х g в течение 30 с.

7.3.9 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведённой 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.

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

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

Таблица 6 – Интерпретация результатов исследования контрольных образцов

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Положительный контрольный образец				
Cp/Ct указан	Cp/Ct не указан	**Cp/Ct указан**	**Cp/Ct указан**	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец				
Cp/Ct не указан	**Cp/Ct указан**	Cp/Ct не указан	Cp/Ct не указан	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

9.2 В биологических образцах, содержащих РНК выявляемых набором вирусов, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по соответствующему каналу детекции (Fam/Green, Rox/Orange или Cy5/Red), Таблицы 7, 8.

9.3 В биологических образцах, не содержащих РНК выявляемых набором вирусов, 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.

9.4 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).

9.5 Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из клинического 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 клинического материала (выполняется последовательно).

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

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 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	Результат недостоверный. Требуется либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического 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**

9.6 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.

9.7 При наличии положительного результата (экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam/Green, Rox/Orange или Cy5/Red) в отрицательном контрольном образце (К-), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

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

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

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 Ср (Ср менее 25 или Ct 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 (A или B) и SARS-CoV-2 может встречаться в 0,5–5% случаев, увеличиваясь с возрастом пациентов.

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

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 надежных 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

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

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 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.

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

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон	REF	Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
LOT	Серия набора		Нестерильно
	Дата изготовления		Одноразовое использование

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

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

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», ООО «ДНК-Технология ТС» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.
Адрес: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Место производства:

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.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 12 000–16 000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (18–25 °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 комнатной температуре (18–25 °С).

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

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 комнатной температуре (18–25 °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 12 000–16 000 x g в течение 30 с при комнатной температуре (18–25 °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.

Старший научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
к.б.н.

Л.В. Артемова

«03» 03 2022 г.

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