

УТВЕРЖДАЮ

Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ»

Минобороны России

«15» марта 2021 г.

С.В. Борисевич



ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ВОО-РВ)»

2021 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
1.1 Наименование набора реагентов	3
1.2 Предназначение набора реагентов и его диагностическая роль	3
1.3 Область применения набора реагентов	4
1.4 Показания, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением набора реагентов по назначению	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
2.1 Формы выпуска	5
2.2 Состав набора реагентов	6
2.3 Метод исследования	8
2.4 Ограничения метода	10
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	12
3.1 Аналитические характеристики	12
3.2 Диагностические характеристики	15
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ	16
4.1 Необходимость обучения персонала	17
4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора	17
4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов	18
4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков	18
5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ	19
5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование	19
5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования	19
5.3 Дозирующие устройства	20
5.4 Другое используемое оборудование	20
5.5 Лабораторная посуда	21
5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора реагентов	21
6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	22
6.1 Тип исследуемых образцов	22
6.2 Процедура получения биологического материала	23
6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала	24
6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов	25
6.5 Меры предосторожности к материалу исследования	26
7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	27
7.1 Выделение нуклеиновых кислот комплектом реагентов «М-Сорб-ООМ»	277
7.2 Проведение ПЦР-РВ анализа	32
7.3 Учет результатов анализа	38
8. РАСЧЕТЫ	41
8.1 Используемые компьютерные программы	41
9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	41
9.1 Условия хранения набора реагентов	41
9.2 Условия транспортирования набора реагентов	41
9.3 Условия эксплуатации и срок годности набора реагентов	41
9.4 Информация по безопасной утилизации	42
9.5 Гарантийные обязательства производителя	43
10. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	44
БИБЛИОГРАФИЯ	45

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВОО	вирус оспы обезьян
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в реальном времени
МАНК	методы амплификации нуклеиновых кислот
НК	нуклеиновая кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО-ВОО	положительный контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОКО-В	отрицательный контрольный образец выделения
ОО	оспа обезьян
ВПК-В	внутренний положительный контроль выделения
ТКО	твердые коммунальные отходы
МИ	медицинское изделие
МР	методические рекомендации
ПБА	патогенные биологические агенты
БСА	бычий сывороточный альбумин

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Наименование набора реагентов

1.1.1 Полное наименование набора реагентов: «Набор реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ВОО-РВ)».

1.1.2 Сокращённое наименование набора реагентов: «ОМ-Скрин-ВОО-РВ».

1.2 Предназначение набора реагентов и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» - медицинское изделие (МИ) для диагностики *in vitro*, предназначенное для качественного определения ДНК вируса оспы обезьян (вид *Monkeypox virus*, род *Orthopoxvirus*, семейство *Poxviridae*) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и флуоресцентной детекцией в препаратах НК, выделенных из проб биологического материала человека, полученных при взятии мазков со

слизистой оболочки ротоглотки и миндалин, венозной крови, содержимого кожных поражений, аутопсийного материала.

Диагностическая роль набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» заключается в возможности его использования для этиологической диагностики оспы обезьян (ОО) с помощью МАНК при исследовании биологического материала от больного (подозрительного на заболевание).

1.3 Область применения набора реагентов

Область применения набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» – клиническая лабораторная диагностика оспы обезьян. Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» может быть использован в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность и лабораториях, имеющих лицензию на проведение работ с микроорганизмами I-II группы патогенности.

1.4 Показания, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением набора реагентов по назначению

1.4.1 Показания к проведению исследования

Лабораторное исследование на оспу обезьян с применением МАНК проводится в ходе обследования лиц с подозрением на ортопоксвирусную инфекцию. Отрицательные результаты лабораторного исследования не исключают возможность инфицирования вирусом оспы обезьян и не должны использоваться в качестве единственного критерия при постановке диагноза.

Популяционные и демографические аспекты применения набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» не оценивались ввиду отсутствия влияния возрастно-половой структуры на природу аналитов и результаты исследования.

1.4.2 Противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты

В ходе менеджмента риска установлено, что применение медицинского изделия для диагностики *in vitro* – набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» не создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не

используют внутри или на теле человека, следовательно, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» по назначению – отсутствуют.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» не подлежит использованию в случаях:

- нарушенной внутренней упаковки и/или не соответствующего описанию внешнего вида;
- несоблюдения условий транспортирования и/или хранения согласно инструкции;
- истекшего срока годности.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Компоненты, входящие в состав набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» техническому обслуживанию, ремонту и калибровке не подлежит.

2.1 Формы выпуска

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» выпускается в 2 формах:

Форма выпуска 1 включает:

- комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ручным способом и на автоматизированных станциях выделения нуклеиновых кислот – Процессоре магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (ПУ РФ №ФСЗ 2009/05562) «М-Сорб-ООМ» (сокращённое наименование комплекта реагентов: «М-Сорб-ООМ»);

- комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» (сокращённое наименование комплекта реагентов: «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»).

Форма выпуска 2 включает:

- комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» (сокращённое наименование комплекта реагентов: «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»).

Форма выпуска 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию нуклеиновых кислот из биологического материала человека методом сорбции на магнитных частицах и амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Форма выпуска 2 предназначена для проведения амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакцией в реальном времени. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплект реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008», РУ РФ №ФСР 2008/03147 – для проб биологического материала человека, полученного методом отбора мазков со слизистой оболочки ротоглотки, либо комплект реагентов «М-Сорб-ООМ», из состава формы выпуска 1, для проб биологического материала человека, полученных при взятии мазков со слизистой оболочки ротоглотки и миндалин, венозной крови, содержимого кожных поражений, аутопсийного материала.

2.2 Состав набора реагентов

2.2.1 Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ручным способом и на автоматизированных станциях выделения нуклеиновых кислот – Процессоре магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (РУ РФ №ФСЗ 2009/05562) «М-Сорб-ООМ»

Комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» является коммерческим набором реагентов, выпускаемым ООО «Синтол», г. Москва.

Комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» предназначен для выделения нуклеиновых кислот ручным способом или на автоматизированных станциях выделения нуклеиновых кислот – Процессоре магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (РУ РФ №ФСЗ 2009/05562) (далее – автоматизированная станция выделения King Fisher).

Комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» рассчитан на 96 анализируемых проб биологического материала человека (96 выделений), включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» состоит из 7 реагентов.

№	Реагент	Описание	Объем	Кол-во
1.	Лизирующий раствор, ЛОР	прозрачная бесцветная жидкость	50 мл	1 флакон
2.	Сорбирующий раствор, СР	суспензия с осадком темно-коричневого цвета	4 мл	1 флакон
3.	Промывочный раствор, ПР-А	прозрачная бесцветная жидкость	65 мл	1 флакон
4.	Промывочный раствор, ПР-В	прозрачная бесцветная жидкость	65 мл	1 флакон
5.	Промывочный раствор, ПР-С	прозрачная бесцветная жидкость	65 мл	1 флакон
6.	Элюирующий раствор, ЭР	прозрачная бесцветная жидкость	13 мл	1 флакон
7.	Отрицательный контрольный образец выделения, ОКО-В	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка

2.2.2 Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»

2.2.2.1 Комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»

Комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» рассчитан на 96 анализируемых проб (96 реакций), включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» состоит из 5 реагентов.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ВОО	сухое вещество белого цвета	—	12 стрипов по 8 микропробирок
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	1,6 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПК-ВОО	сухое вещество белого цвета	—	1 пробирка
4.	Раствор для разбавления ПК-ВОО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a ,

составляющая 62°C. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.3 Метод исследования

2.3.1 Принцип метода выделения ДНК

Метод выделения нуклеиновых кислот с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» является многошаговым и сочетает высвобождение ДНК из вирусной частицы, сорбцию ДНК на магнитных частицах и осаждение ДНК в присутствии осаждающего реагента. Комбинирование сорбентного и осаждающего методов выделения ДНК обеспечивает высокую эффективность выделения ДНК.

Хаотропный агент гуанидинизотиоцианат обеспечивает разрушение вирусной частицы и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК связывается с силиканизированными магнитными частицами в присутствии осаждающего реагента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции ДНК к магнитному сорбенту происходит переход ДНК с поверхности носителя в раствор, который затем освобождается от частиц сорбента магнитной силой.

В результате указанной процедуры получается препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Для определения наличия ингибиторов ПЦР и оценки эффективности выделения ДНК в состав набора входит внутренний положительный контроль выделения.

2.3.2 Принцип метода выявления ДНК вируса оспы обезьян

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вируса оспы обезьян основано на использовании метода полимеразной цепной реакции в реальном времени.

При амплификации с помощью ПЦР-РВ используют два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена F3L, специфичного для вируса оспы обезьян, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент родоспецифичного для ортопоксвирусов гена D10L, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих нуклеиновые кислоты (НК) внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ и выделения (виртуальная последовательность не встречающаяся в природе), а также три флуоресцентных зонда (FAM, ROX и Cy5). Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени.

Постановка ПЦР-РВ осуществляется на приборах «АНК-32 (32М)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург; ФСР 2010/08892), CFX-96 (Bio-Rad, США; ФСЗ 2008/03399), RotorGene (Qiagen, Германия; ФСЗ 2010/07595), ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия; ФСР 2011/10229), QuantStudio5 (ThermoFisher, США; РЗН 2019/8446) (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Данный набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» реализует преимущества мультиплексной ПЦР-РВ в части одновременного выявления в одной пробе фрагментов ДНК вируса оспы обезьян, а также двух контролей анализа по разным каналам детекции флуоресценции. Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: FAM – ортопоксвирусы; ROX – оспа обезьян; Cy5 – внутренний положительный контроль ПЦР-РВ и выделения.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит ДНК вируса оспы обезьян. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит ДНК вируса оспы обезьян.

2.3.3 Информация о прослеживаемости значений, заданных для ПКО-ВОО

Нуклеотидная последовательность ПКО-ВОО полностью гомологична (фрагменты генов F3L 48360-48438 и D10L 15981-16109 генома вируса оспы обезьян по референсной последовательности NC_003310.1) геному вируса оспы обезьян, одну копию которого содержит каждый вирион вируса оспы обезьян.

2.4 Ограничения метода

В ходе клинических испытаний (ФГБУ «Национальный институт качества» Росздравнадзора) при проведении исследований по интерференции с использованием эндогенных (гемоглобин 200 г/л, муцин 5%) и экзогенных потенциально интерферирующих веществ (Водный раствор хлоргексидина биглюконат 0,05%, «Стоматофит», раствор Люголь, «Мирамистин», 0,01%) и комплекта реагентов «М-Сорб-ООМ» ингибирующего влияния интерферентов на функциональные характеристики набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» в форме выпуска 1 не выявлено.

Для выделения нуклеиновых кислот при использовании набора в форме выпуска 2 необходимо использовать комплект реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008», РУ РФ №ФСР 2008/03147 – для проб биологического материала человека, полученного методом отбора мазков со слизистой оболочки ротоглотки, либо комплект реагентов «М-Сорб-ООМ», из состава формы выпуска 1, для проб биологического материала человека, полученных при взятии мазков со слизистой оболочки ротоглотки и миндалин, венозной крови, содержимого кожных поражений, аутопсийного материала.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК, либо проведения реакции ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных

контрольных образцов выделения (ОКО-В) и ПЦР-РВ (ОКО) (п. 7.3 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутренних положительных контрольных образцов выделения ДНК (ВПК-В).

Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования вирусом оспы обезьян и не должны использоваться в качестве единственного критерия при постановке диагноза.

Отрицательные результаты должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Исследование с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» не гарантирует определение наличия вируса оспы обезьян, если его концентрация в пробе биологического материала ниже заявленной аналитической чувствительности ($1,0 \times 10^3$ копий·мл⁻¹). Для достижения необходимой чувствительности аликвота исходного биологического материала (пробы) должна быть объемом не менее 100 мкл.

При возникновении сомнений относительно правильности положительного результата анализа, проверку соответствия функциональных характеристик набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» проводят методом секвенирования. С этой целью осуществляют амплификацию препарата НК, полученного из пробы с сомнительным результатом, с помощью олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении фрагментов гена фрагменты генов F3L 48360-48438 и D10L 15981-16109 генома вируса оспы обезьян по референсной последовательности NC_003310.1 (Monkeypox virus Zaire-96-I-16, complete genome). Получить аликвоты праймеров возможно по месту производства медицинского изделия – ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России: Московская обл. Сергиево-Посадский р-н, Сергиев Посад-6 г-к. 141306, ул. Октябрьская, д. 11, (496) 552-12-06, Email: 48cnii@mil.ru. Полученный ПЦР-продукт секвенируют методом Сенгера.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Аналитические характеристики «Набора реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ВОО-РВ)» – специфичность, чувствительность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) – были установлены в ходе валидации набора реагентов.

В ходе проведения клинико-лабораторных испытаний, выполненных на лабораторной базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Сергиев Посад-6, Московская область), специалистами ФГБУ «Национальный институт качества» Росздравнадзора были подтверждены заявленные функциональные характеристики МИ ИВД – набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ». Аналитическую специфичность набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» определяли на препаратах, содержащих инаktivированные вирусы: вирус оспы обезьян штамм «Конго-8»; вирус оспы коров штаммы «Пума» и «Н-53»; вирус вакцины штаммы «Б-51», «нейровакцина» и «Л-ИВП»; вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) штамм СоД, вирус новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2) штамм изолят В, вирусы гриппа типа А (H1N1, H5N1) и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) штамм «hRSV-1», аденовирус 5 типа человека, вирус парагриппа 1 типа штамм «Сендай», вирусы простого герпеса 1 и 2 типов в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^5$ копий в миллилитре. Аналитическую чувствительность определяли с помощью серийных разведений инаktivированного штамма «Конго-8» вируса оспы обезьян на биологическом материале (мазки со слизистой оболочки ротоглотки в 1 мл транспортной среды) и крови, полученной от людей без признаков ОРВИ и предварительно протестированных на отсутствие возбудителей респираторных инфекций человека.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – не более $1,0 \times 10^3$ копий ДНК в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹). Внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов - 100%.

3.1.2 Специфичность

Оценка специфичности «Набора реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ВОО-РВ)», проводимая *in silico* с использованием имеющейся на текущий момент геномной информации, включала два исследования: внутривидовую оценку (вероятность ложноотрицательного результата) и межвидовую оценку (вероятность ложноположительного результата). Для оценки вероятности получения ложноотрицательного результата при использовании набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» проанализировали 330 полногеномных последовательностей ВОО, собранных со всех регионов мира и имеющихся в базе данных NCBI (сайт <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). Анализ проводили для каждого из амплифицируемых фрагментов отдельно, а затем оценивали вероятность ложноотрицательного результата в целом. Было подсчитано количество геномов, несущих замены в участках гибридизации праймеров и зондов, и определена вероятность отрицательного результата для каждого праймера и зонда, а также ПЦР в целом. Вероятность получения ложноотрицательного результата исследования в целом, вычисляемая как произведение вероятностей отрицательного результата по каждой реакции, составила 0%.

Для исследования вероятности ложноположительных результатов ПЦР был проведен поиск геномных последовательностей, сходных с последовательностью целевых ампликонов, с помощью инструмента BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), алгоритм выравнивания blastn. Было проведено два поиска: среди геномов ортопоксвирусов, исключая ВОО; среди референсных геномов (refseq_representative_genomes), исключая ортопоксвирусы. Также был проведен анализ выравнивания целевых

ампликонов с гомологичными участками геномов трех ортопоксвирусов, вызывающих инфекции у человека и лабораторно-экспериментальное исследование потенциально выявляемых ампликонов. Анализ проводили для каждого из амплифицируемых фрагментов отдельно. Проведенное исследование показало, что разработанный набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» не дает ложноположительных результатов на генетическом материале клинически значимых ортопоксвирусов либо других организмов.

Специфичность – отсутствовали ложноположительные результаты при анализе образцов НК *in vitro*: вируса оспы коров штаммы «Пума» и «Н-53»; вируса вакцины штаммы «Б-51», «нейровакцина» и «Л-ИБП»; вируса новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2) штамм изолят В, вируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) штамм СоД, вирусов гриппа типа А (H1N1, H5N1) и В, респираторно-синцитиального вируса (РСВ) штамм «hRSV-1», аденовируса 5 типа человека, вируса парагриппа 1 типа штамм «Сендай», вируса простого герпеса 1 и 2 типов в концентрации не менее $1,0 \cdot 10^5$ копий ДНК в миллилитре.

3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость

В ходе валидации набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» в различных сочетаниях форм выпуска, автоматизированного и ручного выделения НК, пяти видов амплификаторов, мест и времени анализа, а также различными операторами, была проведена оценка прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости. Повторяемость и воспроизводимость определения ДНК ВОО были установлены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой реагент ПКО-ВОО и стандартный образец предприятия, содержащий ДНК ВОО, в качестве отрицательных образцов были использованы реагенты ОКО и ОКО-В.

Под повторяемостью понимали степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним

и тем же оператором, с использованием одного и того же комплекта оборудования в пределах короткого промежутка времени. Под воспроизводимостью понимали степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, с использованием различных комплектов оборудования, разных серий наборов реагентов.

Внутрипостановочная повторяемость результатов исследования контрольных образцов на выявление ДНК вируса оспы обезьян набором реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» во всех формах выпуска на пяти видах амплификаторов составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 10-ти повторов каждого образца не более 2,96% (для двух серий). Межсерийная воспроизводимость результатов исследования контрольных образцов на выявление ДНК вируса оспы обезьян набором реагентов во всех формах выпуска на пяти видах амплификаторов составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторов каждого образца не более 2,46%.

3.2 Диагностические характеристики

Клинические испытания МИ ИВД набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» выполнены специалистами ФГБУ «Национальный институт качества» Росздравнадзора (г. Москва).

Диагностическая чувствительность обнаружения ДНК вируса оспы обезьян – клинические испытания, проведенные на 292 смоделированных положительных образцах, продемонстрировали 100% чувствительность (интервал 97,36-100,0%, с доверительной вероятностью 95%);

Диагностическая специфичность обнаружения ДНК вируса оспы обезьян – клинические испытания, проведенные на 222 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 98,04%-100%, с доверительной вероятностью 95 %).

Клинические испытания по оценке специфичности выполнены с использованием инаktivированных вирусов: вируса оспы коров штаммы

«Пума» и «Н-53»; вируса вакцины штаммы «Б-51», «нейровакцина» и «Л-ИВП»; вируса новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2) штамм изолят В, вируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) штамм СоД, вирусов гриппа типа А (H1N1, H5N1) и В, респираторно-синцитиального вируса (РСВ) штамм «hRSV-1», аденовируса 5 типа человека, вируса парагриппа 1 типа штамм «Сендай», вируса герпеса 1 типа вакцинный штамм ВОГ (вирус обычного герпеса) (штамм УС), вируса герпеса 2 типа вакцинный штамм ВОГ (вирус обычного герпеса) (штамм ВН). Перекрестно реагирующих вирусов обнаружено не было.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

Потенциальный риск применения набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» – класс 3 (в соответствии с Приказом МЗ РФ от 06.06.2012 №4н).

Безопасность набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», включающее допустимость рисков, с учетом общепризнанного уровня техники для определения пригодности медицинского изделия в целях размещения его на рынке в соответствии с предусмотренным применением/предусмотренным назначением, регламентирована ГОСТ ISO 14971-2021.

Вирус оспы обезьян относится к I группе патогенности.

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению ДНК ВОО, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность вирусом оспы обезьян проводят в соответствии с требованиями санитарных правил и норм по профилактике инфекционных болезней (СанПиН 3.3686-21), методическими указаниями «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо обеспечить соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение по обеспечению безопасности при проведении работ с ПБА I-II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» необходимо соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». При работе с набором реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- - пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- запрещается принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

• Компонент «Лизирующий раствор, ЛОР» классифицируется как опасный. Коды заявленной опасности: химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи – H302, H332, H315; химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз – H319; химическая продукция, вызывающая коррозию металла H290.

Компонент «Разбавитель, РБ» содержит азид натрия.

При работе с набором реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» следует избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

В состав компонента набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» РС-ВОО входят следующие материалы животного происхождения – БСА и рекомбинантная *Taq*-полимераза, являющиеся биологически безопасными.

При использовании набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку входящие в состав медицинского изделия вещества (*Taq*-полимераза и БСА) являются биологически безопасными.

Применение медицинского изделия для диагностики *in vitro* – набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» не создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не используют внутри или на теле человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для проведения ПЦР-РВ анализа – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам):

- ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия; ФСР 2011/10229);
- «АНК-32 (32М)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург; ФСР 2010/08892);
- CFX-96 (Bio-Rad, США; ФСЗ 2008/03399);
- RotorGene (Qiagen, Германия; ФСЗ 2010/07595);
- QuantStudio5 (ThermoFisher, США; РЗН 2019/8446).

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот ручным способом и на автоматизированных станциях выделения нуклеиновых кислот – Процессоре магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (РУ РФ №ФСЗ 2009/05562) «М-Сорб-ООМ», из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», следует проводить в боксах биологической безопасности не ниже 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия, РУ РФ №ФСР 2012/13259), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

Комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» для выделения нуклеиновых кислот может быть использован в автоматизированных станциях выделения нуклеиновых кислот – Процессоре магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (ThermoFisher, США, РУ РФ №ФСЗ 2009/05562). Автоматизированная станция для выделения нуклеиновых кислот – Процессор магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (РУ РФ №ФСЗ 2009/05562) - далее автоматизированная станция выделения KingFisher, должна быть установлена в рабочей зоне 2 (в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-

09). Файл с программой выделения ДНК на автоматизированной станции выделения KingFisher предоставляет по запросу производитель набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ».

Работу с комплектом реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», из состава набором реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», следует проводить в боксах биологической безопасности II (I) класса защиты или ПЦР-боксе (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия, РУ РФ №ФСР 2010/07114), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

- Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл и на 100-1000 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

5.4.1 Для выделения ДНК ручным методом

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100°C (например, «Циклотемп-303», РУ РФ № ФСР 2009/05970);

- центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5425, РУ РФ № ФСЗ 2009/04411);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901», РУ РФ № РЗН 2014/1454);

отсасыватель медицинский (например, ОМ-1, РУ РФ № ФСР 2010/08928);

штативы для наконечников и микропробирок объемом 1,5 и 2 мл;

- магнитный штатив (например, кат. номер СТ-16, ООО Синтол);

холодильник на 2-8°C.

5.4.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях выделения KingFisher

Автоматизированная станция выделения KingFisher;

холодильник на 2-8°C.

5.4.3 Для постановки ПЦР-РВ анализа

Микроцентрифуга-встряхиватель (вортекс) (например, «Циклотемп-901», РУ РФ № РЗН 2014/1454);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903», РУ РФ № ФСР 2009/05969);

штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ООО Синтол);

холодильник/морозильник на 2-8°C/минус 16-20°C.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора реагентов

5.6.1 Для выделения ДНК ручным методом

Комплект реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008», РУ РФ №ФСР 2008/03147 – для формы выпуска 2;

микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

5.6.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях выделения KingFisher

Одноразовые насадки на магнитные стержни для магнитной сепарации для автоматизированной станции выделения KingFisher;

одноразовые планшеты 96-луночные глубокие для автоматизированной станции выделения KingFisher;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места и автоматизированной станции.

5.6.3 Для постановки ПЦР-РВ анализа

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;

• одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

• отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

6.1 Тип исследуемых образцов

Биологическим материалом человека для исследования являются:

• - для формы выпуска 1 - материал, полученный при взятии мазков со слизистой оболочки ротоглотки и миндалин, венозной крови, содержимого кожных поражений, аутопсийного материала;

- для формы выпуска 2, при использовании комплекта реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008», РУ РФ №ФСР 2008/03147 - пробы биологического материала человека, полученные методом отбора мазков со слизистой оболочки ротоглотки, при использовании комплекта

реагентов «М-Сорб-ООМ» из состава формы выпуска 1 - пробы биологического материала человека, полученные при взятии мазков со слизистой оболочки ротоглотки и миндалин, венозной крови, содержимого кожных поражений, аутопсийного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Для проведения исследования взятие проб биологического материала человека осуществляют в соответствии с требованиями методических указаний «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

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

Мазок со слизистой оболочки ротоглотки и миндалин берется стерильным тампоном (например, РУ РФ № ФСР 2011/11334), который после взятия биологического материала помещается в стерильную пластиковую пробирку с транспортной средой (например, РУ РФ № ФСР 2009/05515).

- Содержимое кожных поражений (везикул или пустул) отсасывают туберкулиновым шприцем, прокалывая стенку пузырька у его основания; для этой цели может использовать игла, конец которой помещают над открытой пробиркой и несколько наклоняют вниз, что облегчает отток жидкости. При недостаточной наполненности пузырьков скальпелем или маленькими ножницами срезают верхушки пузырьков и помещают их в отдельную пробирку, корочки отделяются глазным пинцетом.

Взятие крови производят натошак или через 3 ч после приема пищи из периферической вены специальной одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа "Vacuett" (сиреневые крышки - 6% ЭДТА). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется и выделение ДНК/РНК станет невозможным). Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Аутопсийный материал (включая ткани печени, селезенки, лёгкого, кожи) забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка. Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в охлажденную фарфоровую ступку и добавляют 0,5-1,0 мл охлажденного 0,9% раствора натрия хлорида стерильного (стерильный физиологический раствор) или фосфатно-солевого буферного раствора, или транспортная среда с муколитиком («Реагент для транспортировки и хранения клинического материала «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» по ТУ9398-098-01897593-2009», РУ ФСР 2009/05514). Гомогенизировать, тщательно растирая фарфоровым пестиком для получения однородной суспензии. 100 мкл полученной суспензии перенести в пробирки объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром, для последующей экстракции НК (МР «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Биологический референтный интервал применения набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» составляет от $1,0 \cdot 10^{11}$ до $1,0 \cdot 10^3$ копий ДНК участков генов F3L и D10L генома ВОО в миллилитре пробы.

Выделение ДНК проводят с помощью комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот ручным способом и на автоматизированных станциях выделения нуклеиновых кислот – Процессоре магнитных частиц

для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков KingFisher (ПУ РФ №ФСЗ 2009/05562) «М-Сорб-ООМ». Для достижения необходимой чувствительности аликвота исходного материала (пробы) объемом должна быть не менее 100 мкл.

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (ОКО-В), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения НК.

Для контроля ПЦР-РВ и выделения нуклеиновых кислот используют внутренний положительный контроль выделения (ВПК-В). Регистрация роста сигнала по каналу Cy5 свидетельствует об успешном проведении амплификации ДНК. Сдвиг порогового цикла амплификации каналу Cy5 с величиной ΔC_t не менее 3 циклов относительно пробирки ОКО свидетельствует об успешном выделении ДНК.

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование образцов биологического материала в лабораторию и его хранение до проведения исследований проводят в соответствии с требованиями методических указаний «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09), (таблица 1).

Таблица 1 – Условия транспортирования и хранения биоматериала.

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспортировка	Условия хранения до тестирования	Комментарии
Мазок со слизистой ротоглотки и миндалин	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков	4°C	<= 2 дней: 4°C > 2 дней: -20°C	Для транспортировки образцов используют ТС (транспортную среду), содержащую противогрибковые и антибактериальные добавки
Содержимое кожных поражений	Пластиковые пробирки Стерильные контейнеры	4°C	<= 2 дней: 4°C > 2 дней: -20°C	
Кровь	Стерильная пробирка с антикоагулянтом	4°C	24 часа: 4°C	Замораживание образцов цельной крови недопустимо
Аутопсийный материал	Пластиковые пробирки Стерильные контейнеры	4°C	<= 3 дней: 4°C <= 1 нед -20°C	

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя оспы обезьян должны осуществляться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами по профилактике инфекционных болезней (СанПиН 3.3686-21).

Образцы биологического материала утилизируют по классу В, как эпидемиологически опасные медицинские отходы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение нуклеиновых кислот комплектом реагентов «М-Сорб-ООМ»

Процедуру выделения нуклеиновых кислот с помощью комплекта реагентов «М-Сорб-ООМ» проводят ручным методом или на автоматизированных станциях выделения KingFisher в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

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

- Для определения наличия ингибиторов ПЦР-РВ и оценки эффективности выделения нуклеиновых кислот в состав набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» (комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ») входит внутренний положительный контроль выделения (ВПК-В) который добавляется в пробы и ОКО-В на этапе выделения нуклеиновых кислот.

7.1.1 Проведение выделения нуклеиновых кислот ручным методом

- В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (ОКО-В) (1 на 10-24 исследуемых образца при ручном выделении или 1 на 24-48 при автоматическом выделении), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения нуклеиновых кислот.

- **ВНИМАНИЕ!** При возникновении «аварии» на каком-либо этапе во время выделения нуклеиновых кислот (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца биологического материала попали на рабочую поверхность и т.д.), необходимо сменить перчатки и провести деконтаминационные работы!

ВНИМАНИЕ! При хранении в холодильнике от плюс 2 до плюс 8°C возможна кристаллизация ЛОР. В случае необходимости, пробирку с ЛОР следует прогреть при температуре не выше плюс 65°C до полного исчезновения кристаллов. Все остальные реактивы необходимо

предварительно довести до комнатной температуры и перемешать плавным переворачиванием.

I. Лизис

- Маркируют необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с планом исследования. Пробирки с **ОКО-В** расставляют в соответствии с маркировкой между образцами (1 на 10-24 исследуемых образцов).
- Вносят в пробирки по 500 мкл лизирующего раствора **ЛОР** и по 10 мкл **ВПК-В**;
- Флакон с сорбирующим раствором **СР** тщательно перемешивают и вносят в пробирки по 40 мкл **СР**.

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта реагентов «М-Сорб-ООМ» в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором **ЛОР** добавить весь объем внутреннего положительного контроля выделения **ВПК-В** и сорбирующего раствора **СР**. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в подготовленные пробирки по 550 мкл рабочего раствора.

- В каждую пробирку **ОКО-В** вносят по 100 мкл **ОКО-В** из комплекта;
- Вносят по 100 мкл **исследуемой пробы** в подготовленные пробирки, за исключением пробирок с **ОКО-В**. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугируют для сброса капель и помещают в термостат;
- Образцы выдерживают в термостате при температуре 65°C в течение 10 минут, периодически перемешивая;
- Вынимают пробирки из термостата, охлаждают при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Пробирки со смешанными реагентами **ЛОР**, **СР** и **ВПК-В** можно приготовить заранее и хранить при 2-8°C в защищенном от света месте в течение 7 дней. Использовать готовые пробирки по необходимости, предварительно доведя до комнатной температуры с последующим

центрифугированием на микроцентрифуге-встряхивателе при максимальных оборотах в течение 10 секунд.

II. Сорбция и осаждение ДНК

- Тщательно перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента и выдерживают 7 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая;
- Устанавливают пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугируют в течение 3 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;
- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент.

ВНИМАНИЕ! Надосадочную жидкость необходимо отбирать **ПОЛНОСТЬЮ** во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!

- Вынимают пробирки из магнитов и переставляют в обычные лунки.

III. Промывка ДНК

- Добавляют в пробирки 600 мкл промывочного раствора ПР-А, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;
- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;
- Добавляют в пробирки 600 мкл промывочного раствора ПР-В, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;

- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;
- Добавляют в пробирки 600 мкл промывочного раствора ПР-С, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;
- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;
- Устанавливают пробирки с открытыми крышками в термостат и выдерживают при температуре 65°C в течение 7 минут для подсушивания сорбента.

ВНИМАНИЕ! Надосадочную жидкость необходимо отбирать **ПОЛНОСТЬЮ** во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!

IV. Десорбция ДНК

- Готовят чистые 1,5 мл пробирки для следующего этапа (десорбции ДНК). Маркируют.
- Добавляют в пробирки с сорбентом 120 мкл элюирующего раствора ЭР, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- Центрифугируют пробирки кратковременно для сброса капель и устанавливают в термостат;
- Выдерживают пробирки в термостате в течение 7 мин. при температуре 65°C, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе;
- Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹ и устанавливают в магнитный штатив на 1-2 мин.;
- Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, переносят 100 мкл раствора ДНК в чистые пробирки в соответствии с маркировкой.

ВНИМАНИЕ! Если некоторое количество магнитного сорбента было перенесено вместе с раствором ДНК, перед постановкой ПЦР-РВ необходимо установить пробирки с образцами в магнитный штатив и производить забор образца, не вынимая пробирки из магнитного штатива.

7.1.2 Выделение нуклеиновых кислот на автоматизированной станции выделения KingFisher

Для выделения нуклеиновых кислот комплектом реагентов «М-Сорб-ООМ» с помощью автоматизированной станции выделения KingFisher:

- Включают управляющий компьютер и саму автоматизированную станцию выделения KingFisher.
- В чистой ёмкости смешивают лизирующий раствор ЛОР, внутренний положительный контроль выделения ВПК-В и сорбирующий раствор СР.
- Вносят в лунки рабочего планшета 1 по 550 мкл готовой смеси ЛОР+ВПК-В+СР;

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором ЛОР добавить весь объем внутреннего положительного контроля выделения ВПК-В и сорбирующего раствора СР. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в лунки рабочего планшета по 550 мкл рабочего раствора.

- Вносят в лунки планшета 2 по 600 мкл промывочного раствора (ПР-А);
- Вносят в лунки планшета 3 по 600 мкл промывочного раствора (ПР-В);
- Вносят в лунки планшета 4 по 600 мкл промывочного раствора (ПР-С);
- Вносят в лунки планшета 5 по 150 мкл элюирующего раствора (ЭР);
- Вносят в лунки подготовленного планшета 1 по 100 мкл образцов (включая ОКО, ПКО-ВОО)¹;
- Запускают протокол и далее следуют инструкциям протокола.

7.1.3 Условия хранения анализируемых проб (образцов ДНК)

¹ В каждую партию выделения наряду с исследуемыми образцами необходимо включать ОКО-В (1 на 24-48 образцов), который потом обязательно анализируется в ОТ-ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Дополнительно в постановку можно включать положительный контрольный образец, ПКО-ВОО (ПКО-ВОО входит в состав комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ). При выделении полного рабочего планшета (96 образцов) в постановку рекомендуется включать 3 ОКО-В (позиции В2, Е6, G12).

Раствор ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в течение 12 часов и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

7.2 Проведение ПЦР-РВ анализа

ПЦР-РВ анализ проводят в рабочей зоне 3 лаборатории (МУ 1.3.2569-09).

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

7.2.1 Подготовка к проведению ПЦР-РВ анализа

7.2.1.2 Комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»

Расход реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» на одно определение и каждый анализ рассчитывают согласно таблице 3.

Таблица 3 – Расход реагентов комплекта для проведения ПЦР-РВ анализа «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 определение	на каждый анализ
Стрипованные микропробирки, РС-ВОО	1 пробирка	N+2, где N ² – количество исследуемых образцов; 2 – контроли (ПКО-ВОО, ОКО)
РВ	15 мкл	
ПКО-ВОО	-	20 мкл
ОКО	-	20 мкл

- Комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» извлекают из холодильника, ОКО перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;
- В пробирку с сухим содержимым ПКО-ВОО³ добавляют 500 мкл ОКО, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов ПКО-ВОО допускается при

² Отрицательные контроли выделения (ОКО-В) анализируют как исследуемые образцы.

³ Если ПКО-ВОО был приготовлен ранее, то размораживают пробирку с ПКО-ВОО.

температуре не выше минус 16°C в течение срока годности набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»;

- Отбирают необходимое число микропробирок с РС-ВОО, устанавливают в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования. Открывают крышки микропробирок и используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в пробирки по 15 мкл РБ;
- Используя одноразовые наконечники с аэрозольным барьером, вносят в пробирки по 20 мкл ОКО исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО-ВОО, плотно закрывают крышки.

■ **ВНИМАНИЕ!** После смешивания реакционной смеси, разбавителя и препарата ДНК, микропробирки сразу установить в амплификатор и запустить ПЦР-РВ.

7.2.2 Проведение ПЦР-РВ анализа

- Помещают микропробирки в амплификатор в соответствии с протоколом исследования и прикатывают крышки микропробирок;
- Включают амплификатор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;
- Вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 4 и вводят красители FAM (Green), ROX (Orange) и Cy5 (Red). Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Green – 4, Yellow – 5, Orange – 5, Red – 7;

Таблица 4 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	95°C – 300 секунд	1
2	95°C – 10 секунд	50
3	62°C – 30 секунд Считывание сигнала флуоресценции	

- Вводят сведения об образцах по всем красителям и активируют амплификатор в соответствии с инструкцией по эксплуатации;
- Закрывают крышку амплификатора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы амплификатора, расчетное время анализа составляет в среднем 1,5 часа.

7.2.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью амплификаторов для ПЦР-РВ, например, ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия, РУ РФ №ФСР 2011/10229), «АНК-32 (32М)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, РУ РФ №ФСР 2010/08892), CFX-96 (Bio-Rad, США, РУ РФ №ФСЗ 2008/03399), RotorGene (Qiagen, Германия, РУ РФ №ФСЗ 2010/07595), QuantStudio5 (Thermofisher, США, РУ РФ №РЗН 2019/8446) (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции (регистрация роста сигнала, рисунки 1–4) означает любую величину порогового цикла C_t менее 50. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается программой прибора, например, как величина порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах АНК), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы BioRad).

Для определения величины C_t после завершения амплификации поочередно для каждого из каналов FAM и ROX установить уровень пороговой линии на 20-30% от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО-ВОО в последнем цикле амплификации. Подробная информация по установке пороговой линии приведена в инструкции по эксплуатации конкретного амплификатора.

Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналу ROX (Orange) со сдвигом порогового цикла амплификации (ΔC_t) менее 5 циклов относительно циклов по каналу FAM $C_{t_{ROX}} < C_{t_{FAM}} + 5$ означают регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК вируса оспы обезьян в данной микропробирке (рисунок 1).

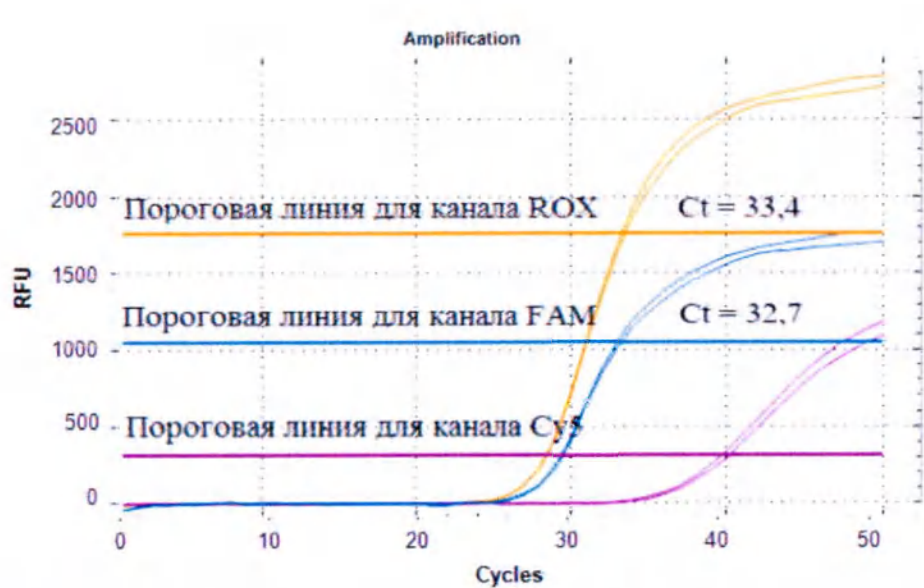
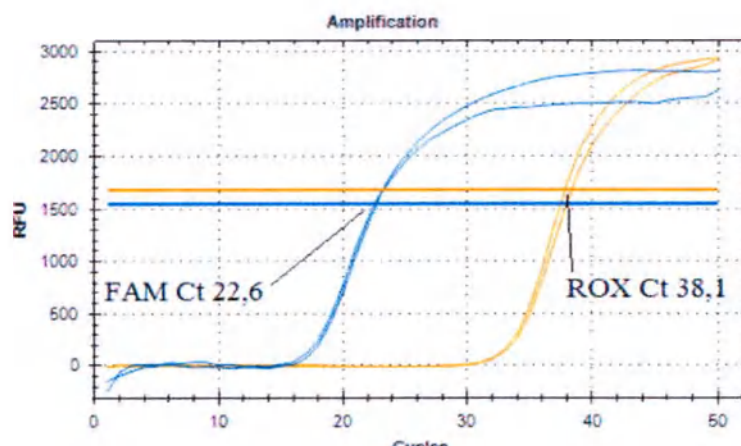


Рисунок 1 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции и пороговые линии по каналам ROX, FAM, Cy5 – положительный результат на BOO ($Ct_{ROX} < Ct_{FAM} + 5$) (CFX-96)

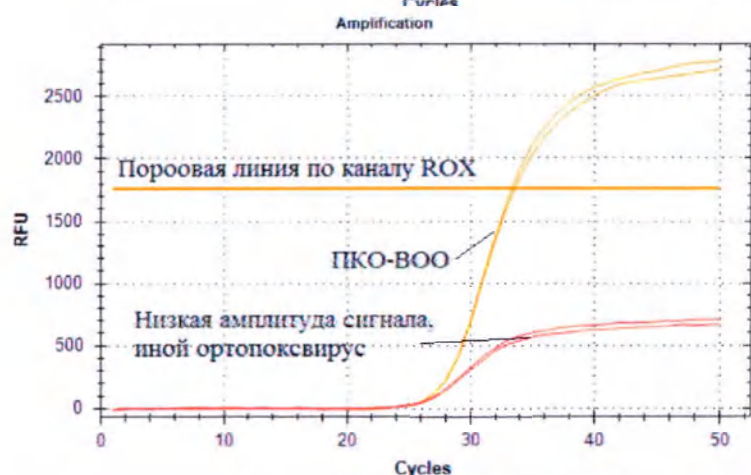
ROX – —
FAM – — Cy5 – —

Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналу **ROX** (Orange) со сдвигом порогового цикла амплификации (ΔCt) более 5 циклов относительно циклов по каналу **FAM** $Ct_{ROX} > Ct_{FAM} + 5$ либо кривая по каналу ROX с амплитудой менее 30% от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО-BOO в последнем цикле амплификации, либо отсутствие амплификации по каналу ROX при условии наличия амплификации по каналу FAM означают регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов ДНК иных ортопоксвирусов в данной микропробирке (рисунок 2).

а)



б)



в)

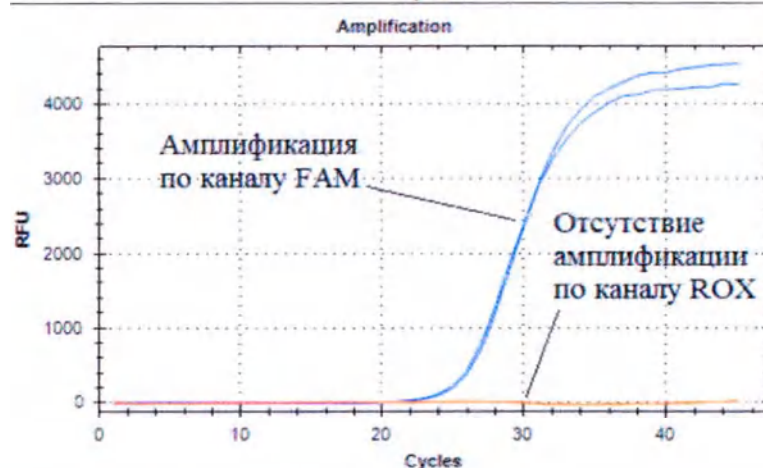


Рисунок 2 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналам ROX, FAM, Cy5 (CFX-96)

а) Отрицательный результат на ВОО, $Ct_{ROX} > Ct_{FAM} + 5$ ($\Delta Ct = 15,5$), выявлена ДНК иного ортопоксвируса; б) Отрицательный результат на ВОО, низкая амплитуда сигнала относительно ПКО-ВОО; в) Отрицательный результат на ВОО, отсутствие амплификации по каналу ROX

ROX – —
FAM – — Cy5 – —

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в случае отсутствия положительной динамики по каналам **FAM** (Green) и **ROX** (Orange) означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном прохождении реакции ПЦР-РВ, и подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК вируса оспы обезьян в данной микропробирке (рисунок 3).

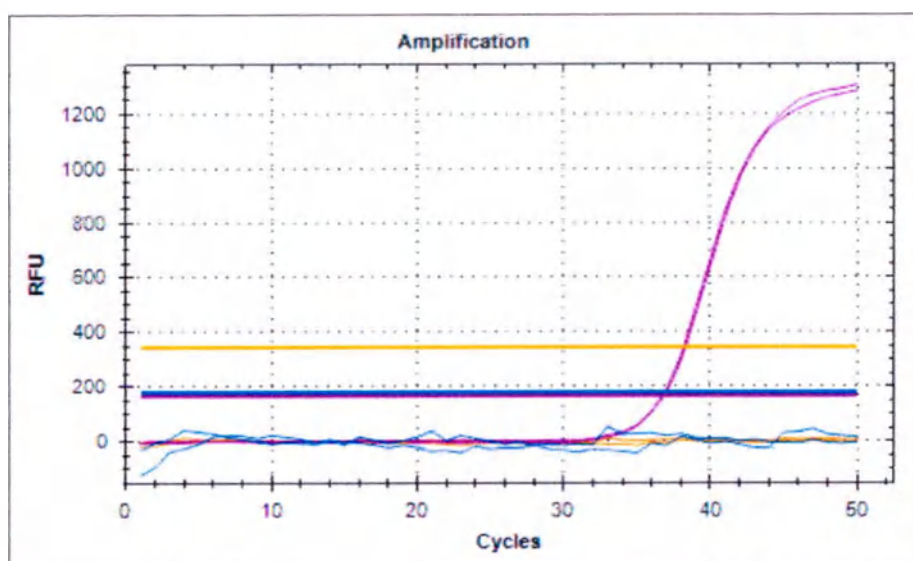
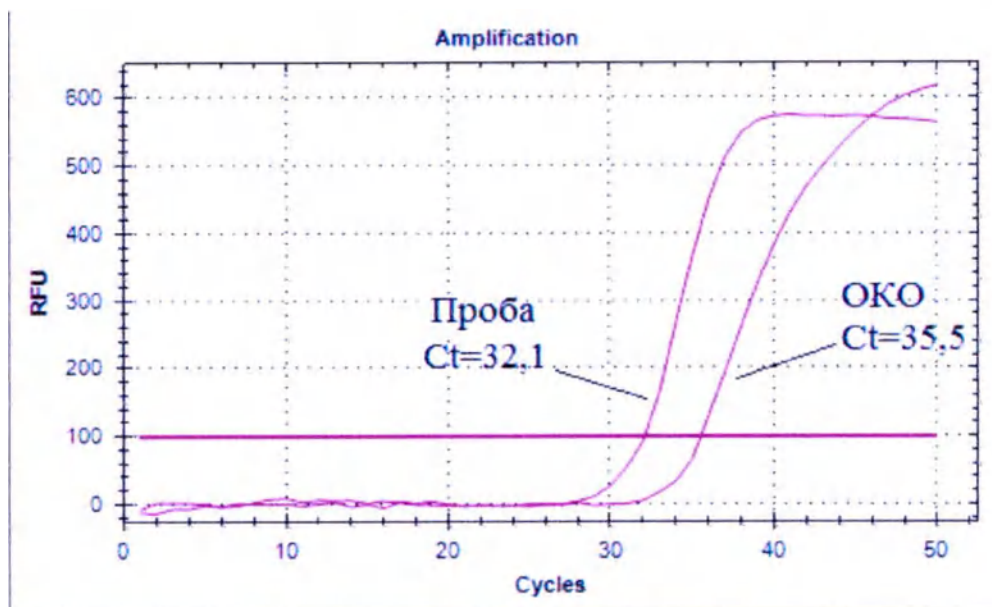


Рисунок 3 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналу Cy5 – отрицательный результат на ВОО (CFX-96)
Cy5 – —

В случае отсутствия сигнала по каналам **FAM** и **ROX** кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу со сдвигом порогового цикла амплификации (ΔCt) не менее 3 циклов относительно пробирки **ОКО** $Ct_{Cy5} < Ct_{Cy5(ОКО)} + 3$ свидетельствует об успешном выделении ДНК из пробы и дополнительно подтверждает отсутствие специфических фрагментов ДНК вируса оспы обезьян в данной микропробирке (рисунок 4).



- Рисунок 4 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналу Cy5 – отрицательный результат на ВОО, $Ct_{Cy5(ОКО-В)} > Ct_{Cy5(ОКО)} + 3$ ($\Delta Ct = 3,4$), выделение ДНК из пробы прошло успешно (CFX-96)
Cy5 – —

7.3 Учет результатов анализа

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала **ОКО (ОКО-В)** по каналу **FAM** (Green) и/или **ROX** (Orange) (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО-ВОО** по каналам **FAM** (Green) и/или **ROX** (Orange), либо в случае регистрации роста сигнала по каналам **FAM** (Green) и/или **ROX** (Orange) с величиной порогового цикла $Ct_{FAM/ROX}$ более 36 (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ОКО-В** по каналу **Cy5** (Red), либо регистрации роста сигнала по каналу **Cy5** (Red) с пороговым циклом $Ct_{Cy5(ОКО-В)}$ более 36,0 (ложноотрицательный результат всего эксперимента);

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирках с исследуемыми образцами по каналу Cy5 (Red)⁴,

- в случае регистрации роста сигнала по каналу Cy5 (Red), если значения пороговых циклов Ct_{Cy5} превышают значения пороговых циклов для ОКО-В $Ct_{Cy5(ОКО-В)}$ более чем на 3 цикла: $Ct_{Cy5} > Ct_{Cy5(ОКО-В)} + 3$ (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ОКО по каналам FAM (Green) и ROX (Orange) и регистрации роста сигнала по каналу Cy5 (Red);

- - в случае отсутствия регистрации роста сигнала ОКО-В по каналам FAM (Green) и ROX (Orange) и регистрации роста сигнала по каналу Cy5 (Red) с пороговыми циклами $Ct_{Cy5(ОКО-В)}$ менее 36,0;

- в случае регистрации роста сигнала в исследуемых образцах по каналу Cy5 (Red), если значения пороговых циклов Ct_{Cy5} не превышают значения пороговых циклов для ОКО-В $Ct_{Cy5(ОКО-В)}$ более чем на 3 цикла: $Ct_{Cy5} \leq Ct_{Cy5(ОКО-В)} + 3$ (рисунок 4);

- - в случае регистрации роста сигнала ПКО-ВОО по каналам FAM (Green) и ROX (Orange) с величиной порогового цикла Ct менее 36.

Регистрация роста сигнала в пробирках с исследуемыми образцами по каналу Cy5 (Red) с пороговым циклом $Ct_{Cy5} \leq Ct_{Cy5(ОКО-В)} + 3$ свидетельствует об успешном прохождении ПЦР-РВ анализа и выделения ДНК в каждой конкретной микропробирке, большие значения Ct свидетельствуют об ингибировании ПЦР-РВ либо потерях на этапе выделения ДНК.

- Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 5.

⁴ В пробирках, имеющих регистрацию роста сигнала по каналам FAM (Green) и/или ROX (Orange), допускается отсутствие регистрации роста сигнала либо регистрация сигнала с величиной $Ct_{Cy5} > Ct_{Cy5(ОКО-В)} + 3$, либо низкая амплитуда кинетической кривой по каналу Cy5 (Red).

Таблица 5 – Интерпретация результатов анализа проб с помощью комплекта реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ»

Результат ПЦР (значение порогового цикла Ct) по каналу флуорофора			Образец	Интерпретация	
FAM (Green)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)			
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев					
+	-	Любой	ПКО-ВОО	Ложноотрицательный результат, ингибирование ПЦР-РВ	
-	+				
-	-	-/+ Ct ≥ 36	ОКО-В	Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения, ингибирование ПЦР-РВ	
+	Любой	Любой	ОКО-В	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК	
Любой	+				
+	Любой		ОКО	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ПЦР-РВ	
Любой	+				
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы					
-	-	-/+ Ct > Ct _{ОКО-В} +3	проба	Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения, ингибирование ПЦР-РВ	
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов					
+	+	+	ПКО-ВОО	Набор реагентов специфичен в отношении ДНК ВОО	
-	-	+ Ct ≤ 36	ОКО-В	Контаминация отсутствует	
-	-	+	ОКО		
-	-	+ Ct ≤ Ct _{ОКО-В} +3	проба	В пробе не обнаружена ДНК ВОО	
+	+ Ct _{ROX} ≤ Ct _{FAM} +5, амплитуда сигнала >30% от ПКО-ВОО	любой			В пробе присутствует ДНК ВОО
+	-		проба		В пробе присутствует ДНК ортопоксвирусов, ДНК ВОО не обнаружена
	+ Ct _{ROX} > Ct _{FAM} +5 либо амплитуда сигнала ≤30% от ПКО-ВОО				
-	+	любой	проба	Недостовверный результат, необходимо повторить анализ начиная с этапа выделения ДНК. При получении повторного результата необходим анализ пробы методом секвенирования	

8 РАСЧЕТЫ

8.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ПЦР-РВ анализа и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем амплификатора, например, программа АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М» или Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно инструкции по эксплуатации амплификатора или их аналогов. Файл с программой выделения ДНК на автоматизированной станции выделения KingFisher предоставляет производитель по запросу на электронный адрес 48cnii@mil.ru.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

9.1 Условия хранения набора реагентов

В соответствии с ТУ 21.20.23-015-08534994-2021: комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8°C; комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Суммарный срок хранения комплекта реагентов «М-Сорб-ООМ» и комплекта реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» при температуре от плюс 9 до плюс 20°C не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ».

9.2 Условия транспортирования набора реагентов

Транспортирование набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» (комплект реагентов «М-Сорб-ООМ» и комплект реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ») должно производиться в соответствии с ТУ 21.20.23-015-08534994-2021 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20°C (без соблюдения «холодовой цепи»).

9.3 Условия эксплуатации и срок годности набора реагентов

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» должен применяться согласно утвержденной инструкции по применению. Для получения достоверных

результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ».

Срок годности набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Набор реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в боксах биологической безопасности и автоматизированной станции выделения KingFisher, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09) и утилизации по классу В, как эпидемиологически опасные отходы (СанПиН 2.1.3684-21).

Комплекты реагентов «М-Сорб-ООМ» набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.3684-21).

Компоненты набора «Лизирующий раствор, ЛОР», классифицирующийся как опасный, и «Разбавитель, РБ», содержащие азид натрия, утилизируются путем смыва их в водопроводно-канализационную систему с предварительным разведением водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный и бытовой мусор.

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе после проведения ПЦР-РВ анализа, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21.

Комплекты реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, а также являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, зарегистрированных в Российской Федерации, а также изделия, обнаруженные и конфискованные таможенными органами Российской Федерации при их ввозе на территорию Российской Федерации, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4[□] классов опасности (СанПиН 2.1.3684-21).

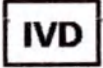
9.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» направлять на предприятие-изготовитель ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России: Московская обл. Сергиево-Посадский р-н, Сергиев Посад-6 г-к. 141306, ул. Октябрьская, д. 11, (496) 552-12-06, Email: 48cnii@mil.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов «ОМ-Скрин-ВОО-РВ», рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

10. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Только для <i>in vitro</i> диагностики
	Температурный диапазон
	Годен до
	Код партии (серия)
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света
	Количество тестов (определений)
	«Восклицательный знак» Сигнальное слово: «Осторожно» Химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи H302: Вредно при проглатывании H332: Вредно при вдыхании H315: При попадании на кожу вызывает раздражение Химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение
	«Жидкости, выливающиеся из двух пробирок и поражающие металл и руку» Сигнальное слово: «Осторожно» Химическая продукция, вызывающая коррозию металла H290: Может вызывать коррозию металлов
	«Пламя» Сигнальное слово: «Осторожно» Химическая продукция, представляющая собой воспламеняющуюся жидкость H227: Горючая жидкость

БИБЛИОГРАФИЯ

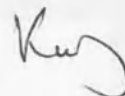
1. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности (МУ 1.3.2569-09).

2. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (СанПиН 3.3686-21).

3. Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий (СанПиН 2.1.3684-21).

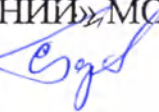
4. Методические рекомендации «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Старший научный сотрудник отдела
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России



Казанцев А.В.

Прошнуровано и пронумеровано 45 листов

Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ
полковник мед. службы  С.Борисевич



ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
ПАСПОРТ КАЧЕСТВА
«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
(ОМ-СКРИН-ВОО-РВ)»
форма выпуска 1

Серия _____ Наборов в серии _____ Дата изготовления _____

Пункт ТУ	Наименование показателя	Требования ТУ 21.20.23-015-08534994-2021	Результаты контроля (соответствует/не соответствует/значение полученной величины (по применимости))
1.3	Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 1 шт. комплект «М-Сорб-ООМ», 1 шт. комплект «ОМ-Скрин-ВОО-РВ». Комплект «М-Сорб-ООМ» включает: 4 флакона объемом 65 мл, 2 флакона объемом 15 мл, 1 пробирку с резьбовой крышкой объемом 1,5 мл. Комплект «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» включает: 12 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, 1 пробирку объемом 2 мл; 2 пробирки объемом 1,5 мл, 1 пробирку объемом 0,5 мл	Соответствует Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 1 шт. комплект «М-Сорб-ООМ», 1 шт. комплект «ОМ-Скрин-ВОО-РВ». Комплект «М-Сорб-ООМ» включает: 4 флакона объемом 65 мл, 2 флакона объемом 15 мл, 1 пробирку с резьбовой крышкой объемом 1,5 мл. Комплект «ОМ-Скрин-ВОО-РВ» включает: 12 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, 1 пробирку объемом 2 мл; 2 пробирки объемом 1,5 мл, 1 пробирку объемом 0,5 мл
1.5, 1.6	Упаковка и маркировка	Полипропиленовые флаконы объемом 65 и 15 мл (с резьбовой крышкой); полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), полипропиленовые пробирки 0,5, 1,5, 2 мл (с резьбовой крышкой), пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги	Соответствует Полипропиленовые флаконы объемом 65 и 15 мл (с резьбовой крышкой); полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), полипропиленовые пробирки 0,5, 1,5, 2 мл (с резьбовой крышкой), пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги
1.2, табл. 1, п. 1, 2	Лизирующий раствор, ЛОР*	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 7,5	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Сорбирующий раствор, СР	Суспензия с осадком темно-коричневого цвета	Соответствует Суспензия с осадком темно-коричневого цвета
	Промывочный раствор, ПР-А	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
	Промывочный раствор, ПР-В	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
	Промывочный раствор, ПР-С	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
	Элюирующий раствор, ЭР	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Отрицательный контрольный образец выделения, ОКО-В	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ВОО**	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Разбавитель, РБ***	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 9,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Положительный контрольный образец, ПКО-ВОО	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Раствор для разбавления ПКО-ВОО, ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В****	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
	Положительный результат ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с величиной порогового цикла Ct менее 36,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналам FAM и ROX. Регистрация роста сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналу Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 36,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналам FAM и ROX. Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналу Cy5

ОБРАЗЕЦ



Пункт ТУ	Наименование показателя	Требования ТУ 21.20.23-015-08534994-2021	Результаты контроля (соответствует/не соответствует/значение полученной величины (по применимости))
1.2, табл. 1, п. 3	Отрицательный результат ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с PC-BOO с ОКО по каналу Cy5. Регистрация роста сигнала с Ct менее 36,0 в пробирках с PC-BOO с ОКО-В по каналу Cy5. Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО и ОКО-В по каналам FAM и ROX.	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с PC-BOO с ОКО по каналу Cy5. Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 36,0 в пробирках с PC-BOO с ОКО-В по каналу Cy5. Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО и ОКО-В по каналам FAM и ROX.
	Аналитическая чувствительность	Регистрация роста сигнала с Ct в диапазоне 32-39 ($32 \leq Ct \leq 39$) в пробирках с PC-BOO с СКО-BOO по каналам FAM и ROX. Регистрация роста сигнала с $Ct \leq 40$ в пробирках с PC-BOO с СКО-BOO по каналу Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct в диапазоне 32-39 ($32 \leq Ct \leq 39$) в пробирках с PC-BOO с СКО-BOO по каналам FAM и ROX. Зарегистрирован рост сигнала с $Ct \leq 40,0$ в пробирках с PC-BOO с СКО-BOO по каналу Cy5

Примечания:

*Классифицируется как опасный. Коды заявленной опасности: H302, H332, H315, H319, H290.

**Содержит дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, специфические праймеры, флуоресцентные зонды, Taq-полимеразу и БСА для проведения ПЦР-РВ.

*** Содержит ПЦР буфер (KCl, TrisHCl (pH 8,8), MgCl₂, глицерол), азид натрия.

**** Содержит ДНК внутреннего положительного контроля.

Заклчение ККВП и ББ: «Набор реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-СКРИН-BOO-РВ)», форма выпуска 1 серии _____ по своим показателям соответствует требованиям ТУ 21.20.23-015-08534994-2021.

Годен до: _____.

Условия транспортирования: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре плюс 2 до 8°C. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20 °C (без соблюдения «холодовой цепи»).

Условия хранения: в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до 8°C. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до 20°C не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

Начальник отдела ККВП и ББ

К. Музуров

Паспорт № _____
« ____ » _____ 202_ г

ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
ПАСПОРТ КАЧЕСТВА
«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
(ОМ-СКРИН-ВОО-РВ)»
форма выпуска 2

Серия _____ Наборов в серии _____ Дата изготовления _____

Пункт ТУ	Наименование показателя	Требования ТУ 21.20.23-015-08534994-2021	Результаты контроля (соответствует/не соответствует/значение полученной величины (по применимости))
1.3	Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 1 шт. «ОМ-Скрин-ВОО-РВ». Комплект ОМ-Скрин-ВОО-РВ» включает: 12 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, 1 пробирку объемом 2 мл; 2 пробирки объемом 1,5 мл, 1 пробирку объемом 0,5 мл	Соответствует Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 1 шт. «ОМ-Скрин-ВОО-РВ». Комплект ОМ-Скрин-ВОО-РВ» включает: 12 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, 1 пробирку объемом 2 мл; 2 пробирки объемом 1,5 мл, 1 пробирку объемом 0,5 мл
1.5, 1.6	Упаковка и маркировка	Полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), 0,5, 1,5, 2 мл (с резьбовой крышкой), пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги	Соответствует Полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), 0,5, 1,5, 2 мл (с резьбовой крышкой), пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги
1.2, табл. 1, п. 1, 2	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-ВОО*	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Разбавитель, РБ**	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 9,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Положительный контрольный образец, ПКО-ВОО	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Раствор для разбавления ПКО-ВОО, ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В***	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
1.2, табл. 1, п. 3	Положительный результат ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с величиной порогового цикла Ct менее 36,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналам FAM и ROX. Регистрация роста сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналу Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 36,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналам FAM и ROX. Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с РС-ВОО с ПКО-ВОО по каналу Cy5
	Отрицательный результат ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с РС-ВОО с ОКО по каналу Cy5. Регистрация роста сигнала с Ct менее 36,0 в пробирках с РС-ВОО с ОКО-В по каналу Cy5. Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО и ОКО-В по каналам FAM и ROX.	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 40,0 в пробирках с РС-ВОО с ОКО по каналу Cy5. Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 36,0 в пробирках с РС-ВОО с ОКО-В по каналу Cy5. Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО и ОКО-В по каналам FAM и ROX.
	Аналитическая чувствительность	Регистрация роста сигнала с Ct в диапазоне 32-39 (32≤Ct≤39) в пробирках с РС-ВОО с СКО-ВОО по каналам FAM и ROX. Регистрация роста сигнала с Ct ≤ 40 в пробирках с РС-ВОО с СКО-ВОО по каналу Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct в диапазоне 32-39 (32≤Ct≤39) в пробирках с РС-ВОО с СКО-ВОО по каналам FAM и ROX. Зарегистрирован рост сигнала с Ct ≤ 40,0 в пробирках с РС-ВОО с СКО-ВОО по каналу Cy5

Примечания:

*Содержит дезоксинуклеозидтрифосфаты, специфические праймеры, флуоресцентные зонды, *Taq*-полимеразу и БСА для проведения ПЦР-РВ.

** Содержит ПЦР буфер (KCl, TrisHCl (pH 8,8), MgCl₂, глицерол), азид натрия.

*** Содержит ДНК внутреннего положительного контроля.



ОБРАЗЕЦ

Заключение ККВП и ББ: «Набор реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ВОО-РВ)», форма выпуска 1 серии _____ по своим показателям соответствует требованиям ТУ 21.20.23-015-08534994-2021.

Годеи до: _____.

Условия транспортирования: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре плюс 2 до плюс 8°C. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20°C (без соблюдения «холодовой цепи»).

Условия хранения: в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 20°C не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

Начальник отдела ККВП и ББ

К. Музуров

Паспорт № _____
«___» _____ 202_ г