

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю. Наумов

20 г.

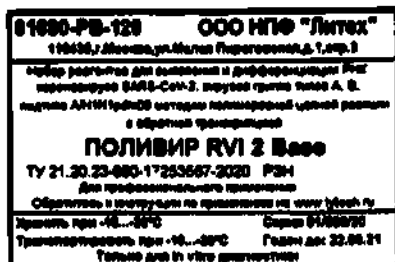
ООО НПФ «Литех»

Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК
коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР RVI 2

по ТУ 21.20.23-680-17253567-2020

Вариант исполнения «Base»

Маркировка набора реагентов

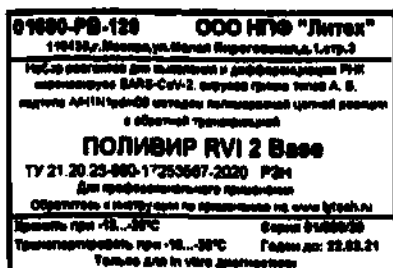


ПОЛИВИР RVI 2 Base	
Состав набора	
1. Реакционная смесь SARS-CoV-2/Н1N1pdm09	1 пробирка x 900 мкл
2. Реакционная смесь InflA/B	1 пробирка x 900 мкл
3. Смесь ферментов	1 пробирка x 900 мкл
4. Разбавитель	3 пробирки x 2 мл
5. ВКО	1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКО RVI	1 пробирка x 200 мкл
7. Раствор для восстановления	1 пробирка x 2 мл
8. Раствор ЭКС	1 пробирка x 1000 мкл

Серия 01/880/20
Годен до: 22.03.21

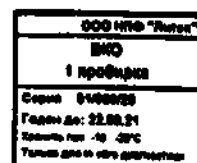
Серия 01/880/20
Дата изготовления: 22.09.20
Годен до: 22.03.21

Маркировка внутренней упаковки



ПОЛИВИР RVI 2 Base	
Состав набора	
1. Реакционная смесь SARS-CoV-2/Н1N1pdm09	1 пробирка x 900 мкл
2. Реакционная смесь InflA/B	1 пробирка x 900 мкл
3. Смесь ферментов	1 пробирка x 900 мкл
4. Разбавитель	3 пробирки x 2 мл
5. ВКО	1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКО RVI	1 пробирка x 200 мкл
7. Раствор для восстановления	1 пробирка x 2 мл
8. Раствор ЭКС	1 пробирка x 1000 мкл

Серия 01/880/20
Годен до: 22.03.21



Вариант исполнения «Base»

Маркировка компонентов набора

ООО НПФ «Литех»
Реакционная смесь SARS-CoV-2/NIH1pdm09 960 мкл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
Реакционная смесь инт./а/в 960 мкл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
Смесь ферментов 900 мкл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
Разбавитель 2 мл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
ПКО RV1 200 мкл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
ВКО (требуется валидация) (обратиться к инструкции)
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
Раствор для восстановления 2 мл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

ООО НПФ «Литех»
Раствор ЭКС 1000 мкл
Серия 01/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОЛИМЕР RV1 2
Base

Вариант исполнения «Express»

Маркировка набора реагентов

010000-PB-120		ООО НПФ "Литех"	
119436, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3			
Набор реагентов для выделения и дифференциации РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусом гриппа типа А, В, подтипа АМ11N1rpt09 методом полимеразной цепной реакции в обратной транскрипции			
ПОЛИВИР RVI 2 Express			
ТУ 21 20 22-000-17253567-2020 РЭИ			
Для профессионального применения			
Обратиться к инструкции по применению на сайте www.litex.ru			
Хранить в холодильнике		Серия 01e/000/20	
Транспортировать при +2...+8°C		Годен до: 22.03.21	
Только для in vitro диагностики			

ПОЛИВИР RVI 2 Express Состав набора

1. Комплект реагентов для выделения РНК.....1 шт
2. Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ...1 шт

Серия 01e/000/20
Годен до: 22.03.21

Внимание!

Комплекты набора хранятся при разных условиях

Маркировка внутренней упаковки

ООО НПФ "Литех"	
Комплект реагентов для выделения РНК	
ПОЛИВИР RVI 2 Express	
Хранить при +2...+8 °C Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР RVI 2 Express

Состав комплекта реагентов для выделения РНК

1. Физиологический раствор...100 пробирок x 0,8 мл
2. РНК-ЭКСПРЕСС.....100 пробирок x 0,2 мл

Серия 01e/000/20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"

комплект реагентов для выделения РНК

Серия 01e/000/20
Дата изготовления: 22.09.20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"	
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ	
ПОЛИВИР RVI 2 Express	
Хранить при -18...-20 °C Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР RVI 2 Express

Состав комплекта реагентов для ОТ-ПЦР-РВ

1. Реакционная смесь SARS-CoV-2N1N1rpt09.....1 пробирка x 900 мкл
2. Реакционная смесь InflA/B.....1 пробирка x 900 мкл
3. Смесь ферментов.....1 пробирка x 900 мкл
4. Разбавитель.....3 пробирки x 2 мл
5. ВКО.....1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКО RVI.....1 пробирка x 200 мкл
7. Раствор для восстановления.....1 пробирка x 2 мл
8. Раствор ЭКС.....1 пробирка x 1000 мкл

Серия 01e/000/20
Годен до: 22.03.21

Серия 01e/000/20
Дата изготовления: 22.09.20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"	
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ	
ПОЛИВИР RVI 2 Express	
Хранить при -18...-20 °C Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР RVI 2 Express

Состав комплекта реагентов для ОТ-ПЦР-РВ

1. Реакционная смесь SARS-CoV-2N1N1rpt09.....1 пробирка x 900 мкл
2. Реакционная смесь InflA/B.....1 пробирка x 900 мкл
3. Смесь ферментов.....1 пробирка x 900 мкл
4. Разбавитель.....3 пробирки x 2 мл
5. ВКО.....1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКО RVI.....1 пробирка x 200 мкл
7. Раствор для восстановления.....1 пробирка x 2 мл
8. Раствор ЭКС.....1 пробирка x 1000 мкл

Серия 01e/000/20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"	
ПКО RVI	
1 пробирка	
Серия 01e/000/20	
Годен до: 22.03.21	
Хранить при -18...-20°C	
Только для in vitro диагностики	

ООО НПФ "Литех"	
ВКО	
1 пробирка	
Серия 01e/000/20	
Годен до: 22.03.21	
Хранить при -18...-20°C	
Только для in vitro диагностики	

Вариант исполнения «Express»

Маркировка компонентов набора

ООО НПФ «Литех»	
РНК-ЭКСПРЕСС	
только для in vitro диагностики	
серия 01a/880/20 дата изготовления: 22.03.20 годен до: 22.03.21	100 пробирок
хранить при +2...+8 °C	

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Физиологический раствор	
только для in vitro диагностики	
серия 01a/880/20 дата изготовления: 22.03.20 годен до: 22.03.21	100 пробирок
хранить при +2...+8 °C	

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
Реакционная смесь BARB-CoV-2/IN1/rdm08 960 мкл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
Реакционная смесь InflA/B 960 мкл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
Смесь ферментов 900 мкл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
Разбавитель 2 мл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
ПКО RVI 200 мкл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
ВНО (контроль эффективности) наборный и тестовый
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
Раствор для восстановления 3 мл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

ООО НПФ «Литех»
Раствор ФНО 1000 мкл
Серия 01a/880/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики

ПОДЛИННИК РНТ 2
Express

Образец маркировки групповой маркировки

Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК
коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР RVI 2 Base

Номер серии 04680120

Дата изготовления 22.09.20

Годен до 22.03.21

Число единиц потребительской упаковки _____

Масса нетто _____

Масса брутто _____

Масса нетто потребительской упаковки _____

Условия хранения:

набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2 Base** должен храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев.

Условия транспортировки:

рекомендуется транспортировать при температуре хранения. Допустима транспортировка при температуре +2°...+8°C в течение трех суток (не более).

Копия на 5 листах верна.

Директор ООО НПФ «Литех»
Наумов А.Ю.

A blue circular stamp of LLC NPF 'LITEX'. The outer ring contains the text 'ЦЕНТРАЛЬНЫЙ АДМИНИСТРАТИВНЫЙ ОКРУГ' at the top and 'ОБЪЕКТЫ С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ' at the bottom. The inner circle contains 'НПФ ЛИТЕХ' and 'Co. Ltd.' at the bottom. A blue ink signature is written across the stamp.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПО «Литех»

А.Ю. Наумов

20 г.

ООО НПО «Литех»

**Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК
коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР RVI 2**

по ТУ 21.20.23-680-17253567-2020

Вариант исполнения «Base»

Маркировка набора реагентов

01000-RB-120	ООО НПО «Литех»
119434, г. Москва, ул. Мещеряковская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР RVI 2 Base	
ТУ 21.20.23-680-17253567-2020 РЭН	
Для профессионального применения	
Обратиться к инструкции по применению на сайте www.litech.ru	
Хранить при -18...-30°C	Серия 01/000/20
Транспортировать при -18...-30°C	Годен до: 22.03.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР RVI 2 Base	
Состав набора	
1. Разбавленная смесь SARS-CoV-2/Н1N1pdm09.....	1 пробирка х 900 мкл
2. Разбавленная смесь H5N1/В.....	1 пробирка х 900 мкл
3. Смесь ферментов.....	1 пробирка х 900 мкл
4. Разбавитель.....	3 пробирки х 2 мл
5. ВКО.....	1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКД RVI.....	1 пробирка х 200 мкл
7. Раствор для восстановления.....	1 пробирка х 2 мл
8. Раствор ЗКС.....	1 пробирка х 1000 мкл
Серия 01/000/20	
Годен до: 22.03.21	

Серия 01/000/20
Дата изготовления: 22.03.20
Годен до: 22.03.21

Маркировка внутренней упаковки

01000-RB-120	ООО НПО «Литех»
119434, г. Москва, ул. Мещеряковская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР RVI 2 Base	
ТУ 21.20.23-680-17253567-2020 РЭН	
Для профессионального применения	
Обратиться к инструкции по применению на сайте www.litech.ru	
Хранить при -18...-30°C	Серия 01/000/20
Транспортировать при -18...-30°C	Годен до: 22.03.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР RVI 2 Base	
Состав набора	
1. Разбавленная смесь SARS-CoV-2/Н1N1pdm09.....	1 пробирка х 900 мкл
2. Разбавленная смесь H5N1/В.....	1 пробирка х 900 мкл
3. Смесь ферментов.....	1 пробирка х 900 мкл
4. Разбавитель.....	3 пробирки х 2 мл
5. ВКО.....	1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКД RVI.....	1 пробирка х 200 мкл
7. Раствор для восстановления.....	1 пробирка х 2 мл
8. Раствор ЗКС.....	1 пробирка х 1000 мкл
Серия 01/000/20	
Годен до: 22.03.21	

ООО НПО «Литех»	
ПКД RVI	
1 пробирка	
Серия 01/000/20	Годен до: 22.03.21
Хранить при -18...-30°C	Только для in vitro диагностики

ООО НПО «Литех»	
ВКО	
1 пробирка	
Серия 01/000/20	Годен до: 22.03.21
Хранить при -18...-30°C	Только для in vitro диагностики

Вариант исполнения «Base»

Маркировка компонентов набора

ООО ЦРМИ "Латекс"
Реакционная смесь SARS-CoV-2/Иммуноглобулин
500 мкл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
Реакционная смесь IgM/IgG
500 мкл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
Смесь ферментов
500 мкл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
Резидентный
2 мл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
ЛКО RV1
200 мкл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
ВКО
(реакция сыворотки пациента и стандарта)
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
Раствор
для восстановления
2 мл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

ООО ЦРМИ "Латекс"
Раствор ЗКС
1000 мкл
Серия 01/000/20
Годен до: 22.03.21
Хранить при -10...-20°C
Только для in vitro диагностики

Вариант исполнения «Express»

Маркировка набора реагентов

01680e-PB-120	ООО НПФ "Литех"
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3	
Набор реагентов для выделения и дифференциации РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	
ПОЛИВИР RVI 2 Express	
ТУ 21.20.23-880-17233567-2020 РЗН	
Для профессионального применения	
Обратитесь к инструкции по применению на www.lytech.ru	
Хранить см. маркировку	Серия 01e/680/20
Комплектов	
Транспортировать при +2...+8 °С	Годен до: 22.03.21
Только для in vitro диагностики	

ПОЛИВИР RVI 2 Express Состав набора

1. Комплект реагентов для выделения РНК.....1 шт
2. Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ...1 шт

Серия 01e/680/20
Годен до: 22.03.21

Внимание!

Комплекты набора хранятся при разных условиях!

Маркировка внутренней упаковки

ООО НПФ "Литех"
Комплект реагентов для выделения РНК
ПОЛИВИР RVI 2 Express
Хранить при +2...+8 °С
Только для in vitro диагностики

ПОЛИВИР RVI 2 Express Состав комплекта реагентов для выделения РНК

1. Физиологический раствор...100 пробирок x 0,5 мл
2. РНК-ЭКСПРЕСС.....100 пробирок x 0,2 мл

Серия 01e/680/20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"

комплект реагентов для выделения РНК

Серия 01e/680/20
Дата изготовления: 22.09.20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ
ПОЛИВИР RVI 2 Express
Хранить при -18...-20 °С
Только для in vitro диагностики

ПОЛИВИР RVI 2 Express Состав комплекта реагентов для ОТ-ПЦР-РВ

1. Реакционная смесь SARS-CoV-2/Н1N1pdm09.....1 пробирка x 960 мкл
2. Реакционная смесь InflA/B.....1 пробирка x 960 мкл
3. Смесь ферментов.....1 пробирка x 900 мкл
4. Разбавитель.....3 пробирки x 2 мл
5. ВКО.....1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКО RVI.....1 пробирка x 200 мкл
7. Раствор для восстановления.....1 пробирка x 2 мл
8. Раствор ЭКС.....1 пробирка x 1000 мкл

Серия 01e/680/20
Годен до: 22.03.21

Серия 01e/680/20
Дата изготовления: 22.09.20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ
ПОЛИВИР RVI 2 Express
Хранить при -18...-20 °С
Только для in vitro диагностики

ПОЛИВИР RVI 2 Express Состав комплекта реагентов для ОТ-ПЦР-РВ

1. Реакционная смесь SARS-CoV-2/Н1N1pdm09.....1 пробирка x 960 мкл
2. Реакционная смесь InflA/B.....1 пробирка x 960 мкл
3. Смесь ферментов.....1 пробирка x 900 мкл
4. Разбавитель.....3 пробирки x 2 мл
5. ВКО.....1 пробирка (лиофилизат)
6. ПКО RVI.....1 пробирка x 200 мкл
7. Раствор для восстановления.....1 пробирка x 2 мл
8. Раствор ЭКС.....1 пробирка x 1000 мкл

Серия 01e/680/20
Годен до: 22.03.21

ООО НПФ "Литех"	ПОЛИВИР RVI 2
ПКО RVI	
1 пробирка	
Серия 01e/680/20	
Годен до: 22.03.21	
Хранить при -18...-20 °С	
Только для in vitro диагностики	

ООО НПФ "Литех"	ПОЛИВИР RVI 2 Express
ВКО	
1 пробирка	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-20°C Только для in vitro диагностики	

Вариант исполнения «Express»

Маркировка компонентов набора

ООО НПФ «Литех»	
РНК-ЭКСПРЕСС	
только для in vitro диагностики	
серия 01e/680/20 дата изготовления: 22.03.20 годен до: 22.03.21 хранить при +2...+8 °C	100 пробирок

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Физиологический раствор	
только для in vitro диагностики	
серия 01e/680/20 дата изготовления: 22.03.20 годен до: 22.03.21 хранить при +2...+8 °C	100 пробирок

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Реакционная смесь AAAS-супер-сенсибилизатор	
900 мкл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Реакционная смесь InflA/B	
960 мкл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Смесь ферментов	
900 мкл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Разбавитель	
2 мл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
ЛКО RV1	
300 мкл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
ВКО (пробный реактив) использовать в оборудовании	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Раствор для деактивации	
3 мл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при +2...+8 °C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

ООО НПФ «Литех»	
Раствор ЭМС	
1000 мкл	
Серия 01e/680/20 Годен до: 22.03.21 Хранить при -18...-30°C Только для in vitro диагностики	

ПОДБИРКА RV1 2
Express

Образец маркировки групповой маркировки

Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК
коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР RVI 2 Base

Номер серии 04/680/20

Дата изготовления 22.09.20.

Гожен до 22.03.21

Число единиц потребительской упаковки _____

Масса нетто _____

Масса брутто _____

Масса нетто потребительской упаковки _____

Условия хранения:

набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2 Base** должен храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев.

Условия транспортировки:

рекомендуется транспортировать при температуре хранения. Допустима транспортировка при температуре +2°...+8°C в течение трех суток (не более).

Копия на 5 листах верна.

Директор ООО НПО «Литех»

Наумов А.Ю.



ВЕКТОР



**Набор реагентов
для выделения
нуклеиновых кислот
из клинических образцов**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

РеалБест экстракция 100

НАБОР РЕАГЕНТОВ

C-8896

Набор реагентов «РеалБест экстракция 100» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов цельной крови, сыворотки (*плазмы*) крови, биоптатов, ликвора, мочи, суспензии клещей и соскобов эпителиальных клеток.

Набор реагентов «РеалБест экстракция 100» может быть применён в клинической практике при диагностике различных инфекций и заболеваний человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или методом обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Набор рассчитан на выделение нуклеиновых кислот из 48 образцов, включая контрольные образцы. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой, включая контроли.

Набор предназначен для применения с наборами для определения НК возбудителей инфекций серии «РеалБест».

1. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

1.1. Принцип действия.

Принцип действия набора «РеалБест экстракция 100» состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками, с последующим спиртовым осаждением нуклеиновых кислот на магнитные частицы, спиртовыми отмывками и последующей элюцией. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР или ОТ-ПЦР.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом и проведении реакции обратной транскрипции и амплификации выбранного фрагмента РНК или амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Для удобства пользователя при работе с набором рекомендуется применение магнитного штатива. Возможно выделение нуклеиновых кислот из 100 и 200 мкл пробы. При выделении НК из цельной крови выделение проводится из 50 мкл пробы.

В состав ПЦР наборов серии «РеалБест» входит **положительный контрольный образец (ПКО)**, соответствующий данному

4

C-8896

ПЦР набору. ПКО должен проходить процедуру выделения наравне с биологическими пробами и **отрицательным контрольным образцом (ОКО)**.

1.2. Состав набора:

Комплект реагентов для выделения НК:

- лизирующий раствор – 8 фл. по 4 мл;
- осадитель НК – 4 фл. по 12 мл;
- раствор для отмывки № 1 – 4 фл. по 8 мл;
- раствор для отмывки № 2 – 4 фл. по 5 мл;
- элюирующий раствор – 12 фл. по 3 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 фл., 1 мл;

Комплект контрольных образцов:

- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 фл. по 4 мл;
- отрицательный контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека (ОКО) – 2 фл, 2 мл;
- внутренний контрольный образец (лиофилизированный концентрат), (ВКО) – 2 фл.;

C-8896

5

2. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

2.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

2.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

2.3. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов или другие возбудители вирусных инфекций.

2.4. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»);
- холодильник на (2-8)°С и минус 20°С («Атлант», Минский Завод Холодильников, Беларусь);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не ниже 13000 об/мин;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» («Bio-Vortex V-1 plus», «BioSan», Латвия);
- термшейкер («Thermo Shaker TS-100 » с блоком SC20N, «BioSan», Латвия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия, или аналогичные);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром (аэрозольным барьером, «FinTip» Финляндия);
- одноразовые наконечники для пипеток («FinTip», Финляндия);
- одноразовые полипропиленовые пробирки на

- 2 мл («SSI», кат. № 2340, США);
- магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (ЗАО «Вектор-Бест», кат. № E9291);
 - штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл («Хеликон», Россия);
 - отсасыватель медицинский (В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР»;
 - контейнер с дезинфицирующим раствором («Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-ПРОЕКТя»), для сброса наконечников со шланга отсасывателя без помощи рук;

4. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

4.1. Подготовка образцов цельной крови.

Внимание! Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.

Кровь забирается в вакуумную пробирку с ЭДТА или с цитратом натрия. После забора крови её необходимо плавными движениями перемешать с антикоагулянтом, находящимся в пробирке.

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре от 18 до 25°C до 6 ч;
- при температуре от 2 до 8°C не более 24 ч.

Замораживание цельной крови не допустимо!

4.2. Подготовка образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внимание! Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать сыворотку (плазму) в отдельную пробирку.

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре от 2 до 8°C не более суток;
- при температуре минус 20°C до 1 месяца.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается!

Образцы сыворотки или плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин при температуре от 18 до 25°C в течение 5 мин.

4.3. Подготовка биоптатов и ликвора.

Биоптаты и ликвор готовы к анализу.

Транспортировать и хранить образцы:

- при температуре от 18 до 25°C до 2 ч;
- при температуре от 2 до 8°C не более суток;
- при температуре минус 20°C до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается!

4.4. Подготовка образцов мочи.

Первую порцию утренней мочи собрать в чистый флакон с плотной крышкой. 1,5-2,0 мл мочи отобрать в пробирку, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удалить практически полностью, не задевая осадок. Полученный клеточный осадок использовать для выделения нуклеиновых кислот.

Транспортировать и хранить образцы клеточного осадка мочи:

- при комнатной температуре (18-25)°C не более 2 часов;
- при температуре (2-8)°C не более 1 суток;
- при температуре минус (18-60)°C не более 2 недель.

4.5. Подготовка суспензий клещей.

Исследуемых клещей поместить в пронумерованные пробирки типа *Eppendorf* объемом 1,5 мл.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (масло, бензин и т.п.), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку. В случае анализа не пивших клещей можно сразу приступить к приготовлению суспензии клещей (см. инструкции к наборам по выявлению НК возбудителей, переносимых клещами).

Предварительная промывка клещей:

Добавить в каждую пробирку с клещом 300 мкл 96% этанола, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя, используя отдельные наконечники для каждой пробы. Далее внести в пробирки по 500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхнуть пробирки на шейкере и сбросить капли со стенок пробирок коротким центрифугированием (при 5000 об/мин в течение 5 с); удалить жидкость из пробирок с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя.

Хранение клещей и образцов суспензий клещей:

- при температуре (2-8)°C – в течение 1 суток;
- при температуре минус (18-60)°C – в течение 2 недель;
- при температуре ниже минус 60°C – длительно (до 1 года).

Транспортировка клещей и образцов суспензий клещей должна осуществляться в специальных термоконтейнерах с хладогеном, термосах с термопакетами, льдом.

4.6. Подготовка образцов соскобов эпителиальных клеток.

Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок, содержащих соскобы эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища.

При использовании **транспортного раствора** производства ЗАО «Вектор-Бест»:

- транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25°C до 2 суток;
- при температуре от 2 до 8°C не более 2 недель;
- при температуре минус 20°C до 2 месяцев.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается!

При использовании транспортных / консервирующих растворов других производителей сроки хранения и транспортировки проб должны соответствовать указанным в инструкциях по их применению.

4.7. Подготовка компонентов набора:

4.7.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре от 18 до 25°C в течение 30 мин.

4.7.2. Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест» флакон с ПКО, соответствующий данному ПЦР набору.

4.7.3. Во флакон с **внутренним контрольным образцом (ВКО)** добавить 1 мл раствора для **восстановления контрольных образцов (РВК)**, аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 1 мес.

4.7.4. ОКО готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8°C не более 1 мес.

4.7.5. Лизирующий раствор перед началом работы прогреть при температуре от 50 до 60°C до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной дисперсии и во флакон с лизирующим раствором добавить **80 мкл суспензии сорбента**. Тщательно перемешать.

Внимание! Лизирующий раствор после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ БИОПРОБ

5.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

5.2. В каждую пробирку внести по **30 мкл раствора ВКО**.

5.3. Для отрицательного контроля в пробирку (маркированную «ОКО») внести **100 мкл ОКО**.

5.4. Для положительного контроля в пробирку (маркированную «ПКО») внести **70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО**.

5.5. В остальные пробирки пипеткой с отдельными наконечниками внести по **100 мкл анализируемых образцов** в соответствии с

маркировкой пробирок. Для увеличения чувствительности можно использовать **200 мкл** исследуемого образца. При выделении НК из цельной крови выделение проводится из **50 мкл** пробы.

5.6. В каждую пробирку добавить по **300 мкл лизирующего раствора с сорбентом**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термощейкере при 65°C с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

В случае, если образец лизировался не полностью, перенести содержимое в чистую пробирку, стараясь не захватить осадок.

5.7. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по **400 мкл осадителя НК**.

5.8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин при комнатной температуре.

5.9. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

5.10. В каждую пробирку к осадку добавить **500 мкл раствора для отмывки № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге.

5.11. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или *отсасывателем*) с отдельным накопником, не задевая осадок.

5.12. В каждую пробирку к осадку добавить по **300 мкл раствора для отмывки № 2**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге.

5.13. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или *отсасывателем*) с отдельным накопником, не задевая осадок.

5.14. Высушить осадки в открытых пробирках при комнатной температуре (18-25)°C в течение 2-3 мин.

5.15. В каждую пробирку к осадку добавить элюирующий раствор.

Если из выделенной биопробы будет производиться от 1 до 3 определений возбудителей

инфекций следует добавить **200 мкл элюирующего раствора**.

Если определений будет производиться больше – добавить **600 мкл элюирующего раствора**.

Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере при 65°C с частотой вращения 1300 об/мин в течение 5 мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 мин.

Пробы готовы к постановке ПЦР или ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенная РНК хранению не подлежит. Готовить в день проведения ОТ-ПЦР.

Выделенная ДНК хранится при температуре (4-8)°C не более 24 ч.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Международные сертификаты
ISO 9001 и ISO 13485

**НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПЦР
С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Вирусные гепатиты В и С,
ВИЧ-инфекция, ИППП,
герпесвирусные инфекции,
токсоплазмоз, краснуха,
клещевые инфекции,
желудочно-кишечные
заболевания,
наборы для выделения НК

Всегда точно – всегда ВОВРЕМЯ!

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности. Допускается транспортирование при температуре до 25°C в течение 10 суток.

Замораживание набора не допускается!

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться

в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

*630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobik@vector-best.ru*

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.

27.05.11

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus)
и гриппа В (Influenza B virus) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ГриппКомплекс

Регистрационное удостоверение:

№ ФСР 2011/12014 от 15 июня 2015 года

Каталожные номера:

Вирус гриппа А (Influenza A virus):

R3-P409-23/4 (пробирки)

R3-P409-S3/4 (стрипы)

Вирус гриппа В (Influenza B virus):

R3-P410-23/4 (пробирки)

R3-P410-S3/4 (стрипы)

Вирус гриппа А и В (Influenza A&B virus):

R3-P431-23/4 (пробирки)

R3-P431-S3/4 (стрипы)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы



СОДЕРЖАНИЕ

1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	4
2.1 Состав набора	5
2.2 Количество анализируемых проб	6
2.3 Принцип метода.....	6
2.4 Время проведения анализа	7
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	9
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	10
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	12
7.1 Подготовка материала к выделению РНК.....	12
7.2 Выделение РНК из биологического материала	13
7.3 Проведение реакции обратной транскрипции	14
7.4 Проведение полимеразной цепной реакции	16
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	17
8.1 Регистрация результатов амплификации при использовании комплектов реагентов Influenza A virus и Influenza B virus.....	17
8.2 Регистрация результатов амплификации при использовании комплекта реагентов Influenza A&B virus	18
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	20
9.1 Учёт результатов реакции при использовании комплекта реагентов Influenza A virus.....	20
9.2 Учёт результатов реакции при использовании комплекта реагентов Influenza B virus.....	20
9.3 Учёт результатов реакции при использовании комплекта реагентов Influenza A&B virus.....	20
10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.....	21
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	22
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	22
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ	22
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	23
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	24
ПРИЛОЖЕНИЕ	25

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ГриппКомплекс

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1 Набор реагентов ГриппКомплекс предназначен для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) в биологическом материале человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки) и материале от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы) *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.2 Функциональное назначение: набор реагентов предназначен для использования *in vitro* (выявление РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) в биологическом материале человека и животных).
- 1.3 Набор может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.4 Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.
- 1.5 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.
- 1.6 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов ГриппКомплекс выпускается в варианте исполнения «ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени».

Вариант исполнения «ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени» (маркируется «Real-time») – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих.

Комплекты реагентов «Influenza A virus» и «Influenza B virus» предназначены для детектирующих амплификаторов «ДТ-322», «ДТлайт», «ДТпрайм» или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Комплект реагентов «Influenza A&B virus» предназначен только для детектирующих амплификаторов «ДТлайт», «ДТпрайм» или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

2.1 Состав набора

В состав набора ГриппКомплекс, в зависимости от формы комплектации, входят следующие комплекты:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК)¹

включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

2. Комплект реагентов для обратной транскрипции включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (25 мкл);
- Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ – 1 пробирка (50 мкл).

3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А, с детекцией в режиме реального времени (Influenza A virus), включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 48 пробирок (по 20 мкл) или 6 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- Таq-полимеразу – 1 пробирка (25 мкл);
- ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
- Крышки для стрипов² – 6 шт.

¹ - включается в набор по запросу.

² - в случае использования стрипованных пробирок.

- 4. Комплект реагентов для ПЦР–амплификации кДНК вирусов гриппа В, с детекцией в режиме реального времени (Influenza B virus), включает:**
- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 48 пробирок (по 20 мкл) или 6 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
 - Таq-полимеразу – 1 пробирка (25 мкл);
 - ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);
 - минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
 - положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
 - Крышки для стрипов² – 6 шт.
- 5. Комплект реагентов для ПЦР–амплификации кДНК вирусов гриппа А и В, с детекцией в режиме реального времени (Influenza A&B virus), включает:**
- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 48 пробирок (по 20 мкл) или 6 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
 - Таq-полимеразу – 1 пробирка (25 мкл);
 - ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);
 - минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
 - положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
 - Крышки для стрипов³ – 6 шт.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор ГриппКомплекс предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией с детекцией результатов 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 Таq-полимеразой.

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

³ – в случае использования стрипованных пробирок.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации искомой кДНК и внутреннего контрольного образца, включены флуоресцентные метки Fam, Rox и Hex соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вирусов гриппа и внутреннего контрольного образца (таблица 1).

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Комплект реагентов	Канал детекции		
	Fam	Hex	Rox
Influenza A virus	Вирус гриппа А	ВК	-
Influenza B virus	Вирус гриппа В	ВК	-
Influenza A&B virus	Вирус гриппа А	ВК	Вирус гриппа В

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Исследование с использованием набора реагентов ГриппКомплекс состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие.

2.4 Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки): 5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих РНК выявляемого вируса гриппа, во время проведения амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительные результаты амплификации специфических фрагментов кДНК (экспоненциальный рост кривой флуоресценции по каналам Fam и/или Rox).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК выявляемого вируса гриппа, при проведении амплификации, регистрируется положительный результат амплификации внутреннего контроля (экспоненциальный рост кривой флуоресценции по каналу Hex) и отрицательный результат амплификации специфических фрагментов кДНК (отсутствие экспоненциального роста кривой флуоресценции по каналам Fam и Rox).

3.2 Аналитическая чувствительность на 1,0 мл образца:

Не более 500 геном-эквивалентов РНК вирусов гриппа А или В.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Общие требования безопасности к наборам реагентов для in vitro диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением её боксами биологической безопасности.

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

Выделение РНК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

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

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

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (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 санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПин 2.1.7.2790-10.

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов ГриппКомплекс требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий («ДТ-322», «ДТлайт»⁴, «ДТпрайм»⁵ или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл с RCF не ниже $16\,200 \times g$ (соответствует 13 000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17);
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 50 °С до 95 °С;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 0,5 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 0,5–10 мкл, 2,0–20 мкл, 20 – 200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;
- комплект для выделения НК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

⁴ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

⁵ – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих «ДТ-322», «ДТлайт», «ДТпрайм» и «ДТ-96»:

- версия ПО не ниже 7.3⁶.
- файлы с параметрами анализа «Influenza_A.ini», «Influenza_B.ini», «InflAB.ini».

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ



6.1 Материал для исследований

Для исследования используют биологический материал человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки) и материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы).

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения РНК из биологического материала.

Решение о выборе места взятия материала для исследования принимает врач.

6.2 Общие требования

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

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

6.3 Взятие образцов биологического материала

6.3.1 Взятие образцов биологического материала человека

6.3.1.1 Мазки из полости носа

Мазки берут сухим стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора или транспортной средой для биопроб.

Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Зонд с биоматериалом переносят в пробирку с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отжимают избыток жидкости. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

⁶ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/page/ip/po-dlya-oborudovaniya>

6.3.1.2 Мазки из ротоглотки

Мазки берут сухим стерильным одноразовым зондом вращательным движением с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки глотки. Зонд помещают в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отжимают избыток жидкости. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

6.3.1.3 Смывы из ротоглотки

Перед взятием смывов из ротоглотки необходимо предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10–15 с) 8,0–10 мл физиологического раствора стерильного. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования. Смывы из ротоглотки (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.3.1.4 Смывы из полости носа

Взятие материала производят в положении больного сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью зонда или одноразового шприца вводят по 3,0–5,0 мл теплого физиологического раствора стерильного. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования. Смывы (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.3.2 Взятие образцов биологического материала животных

6.3.2.1 Мазки из трахеи, полости носа, глотки, клоаки

Мазки берут сухим стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора или транспортной средой для биопроб.

После взятия мазка (из трахеи, полости носа, глотки, клоаки), зонд с биоматериалом переносят в пробирку с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отжимают избыток жидкости. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

6.3.2.2 Внутренние органы

Внутренние органы (фрагменты трахеи и легких, селезенка, мозг, печень и др.) помещают в стерильную сухую посуду, которую плотно закрывают крышкой и маркируют.

6.3.2.3 Фекалии

Пробы фекалий (4-5 г) переносят в стерильную сухую посуду, которую плотно закрывают крышкой и маркируют.

6.4 Транспортирование и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов.

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования при температуре от 2 °C до 8 °C.

В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка материала к выделению РНК

7.1.1 Мазки и смывы

7.1.1.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).

Примечание – Используйте центрифугу для пробирок объемом 1,5 мл с RCF не ниже 16 200 × g (соответствует 13 000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17).

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

7.1.2 Фекалии

7.1.2.1 Перенесите ~250 мг (мкл) фекалий в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного. Встряхните пробирку на вортексе в течение 5–10 с.

7.1.2.2 Центрифугируйте пробирку при 1000 об/мин в течение 2–3 мин при комнатной температуре.

7.1.2.3 Перенесите 800–1000 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре.

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

7.1.3 Внутренние органы животных

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

- 7.1.3.2 Добавьте 1,0 мл физиологического раствора стерильного. Встряхните пробирку на вортексе в течение 3–5 с, центрифугируйте пробирку на микроцентрифуге-вортексе при 1000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 7.1.3.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.2 Выделение РНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект для выделения РНК из биологического материала не входит в состав набора ГриппКомплекс.

Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемый комплект для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала: ПРОБА-НК.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения РНК из биологического материала совместно с комплектами для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения одновременно с выделением из биологического материала РНК необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК).

7.2.1 Выделение РНК с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

Примечания

1. Перед началом работы необходимо проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе (ПРОБА-НК). В случае выпадения осадка лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка. Затем перемешать лизирующий раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования.
2. На данном этапе используйте только одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
3. Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец (К-). Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца и выполните п.п. 7.2.1.1 – 7.2.1.14.

- 7.2.1.1 Добавьте в пробирки с исследуемыми образцами и «К-» по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.
- 7.2.1.2 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.1.3 Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! При выделении РНК вируса гриппа А из тканей внутренних органов животных термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 30 мин, осадите конденсат центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 с и перенесите надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

- 7.2.1.4 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с.
- 7.2.1.5 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.6 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.7 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.2.1.8 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.9 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.10 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.2.1.11 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.12 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.13 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 7.2.1.14 Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения, закройте крышки пробирок и прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 мин.
- 7.2.1.15 Осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Препарат РНК готов для проведения реакции обратной транскрипции.

Полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

7.3 Проведение реакции обратной транскрипции

- 7.3.1 Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объёмом 0,5 мл с учётом пробирки для отрицательного контрольного образца (К–).
- 7.3.2 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С, затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной

температуре.

Примечание - В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

7.3.3 В отдельной пластиковой пробирке приготовьте ОТ-смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера;
- 1,0 x (N+1) мкл «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»;
- 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 6. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 7 (6+1) пробирок, т.е. 14 мкл ОТ-буфера + 7 мкл праймеров + 3,5 мкл обратной транскриптазы.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

7.3.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

7.3.5 Внесите по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки.

7.3.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью (кроме пробирки, промаркированной «К-») по 16,5 мкл соответствующего образца РНК (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.3.7 В пробирку, промаркированную «К-», внесите отрицательный контрольный образец, прошедший этап выделения РНК.

Примечание - Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с фильтром.

7.3.8 Пробирки встряхните на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

7.3.9 Пробирки поместите в термостат и инкубируйте при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.

Примечание – Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

7.3.10 Осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечания:

1. Препарат кДНК допускается хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.
2. Для постановки ПЦР образцы кДНК, хранившиеся при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С, необходимо разморозить при комнатной температуре или при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.4 Проведение полимеразной цепной реакции

7.4.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации: по одной для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 7.

7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.

7.4.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл Taq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+».

Пример: необходимо проанализировать 5 образцов, один «К-» и один «К+».

Промаркированных пробирок – 7. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-полимеразы для 8 (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера + 4 мкл Taq-полимеразы.

7.4.4 Перемешайте приготовленную смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.

Смесь можно хранить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не более одного часа.

7.4.5 Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл перемешанной смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.

7.4.6 В каждую пробирку добавьте по одной капле (около 20 мкл) минерального масла, плотно закройте пробирки.

7.4.7 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл соответствующего препарата кДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).

- 7.4.8 В пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции.
- 7.4.9 В пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.4.10 Все пробирки центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 7.4.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.
- 7.4.12 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий набору ini файл: «Influenza_A.ini», «Influenza_B.ini» или «InflAB.ini». При последующих постановках добавляйте в протокол необходимые тесты (Influenza_A, Influenza_B или InflAB), укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе тестов (Influenza_A, Influenza_B или InflAB) в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.
- Таблица 2 - Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТ-322», «ДТлайт», «ДТпрайм» и «ДТ-96»

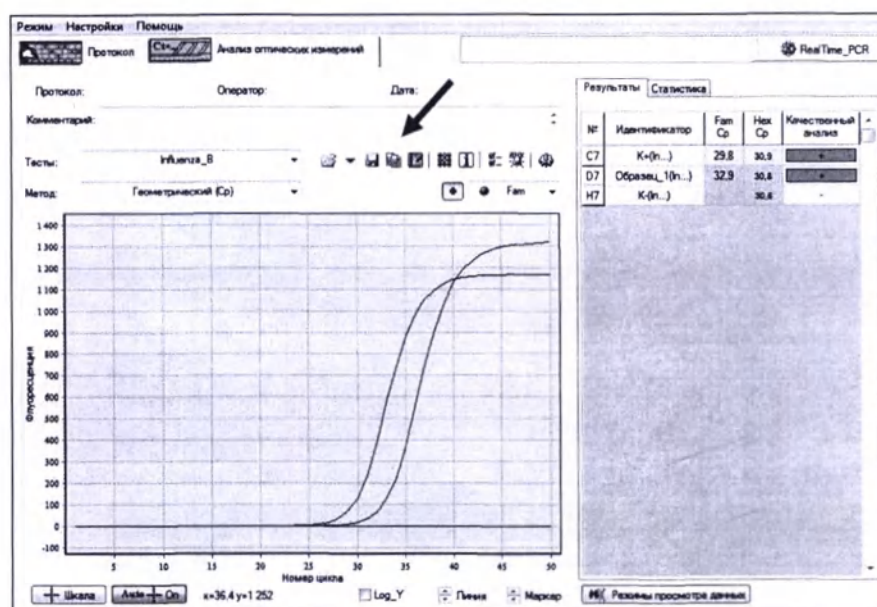
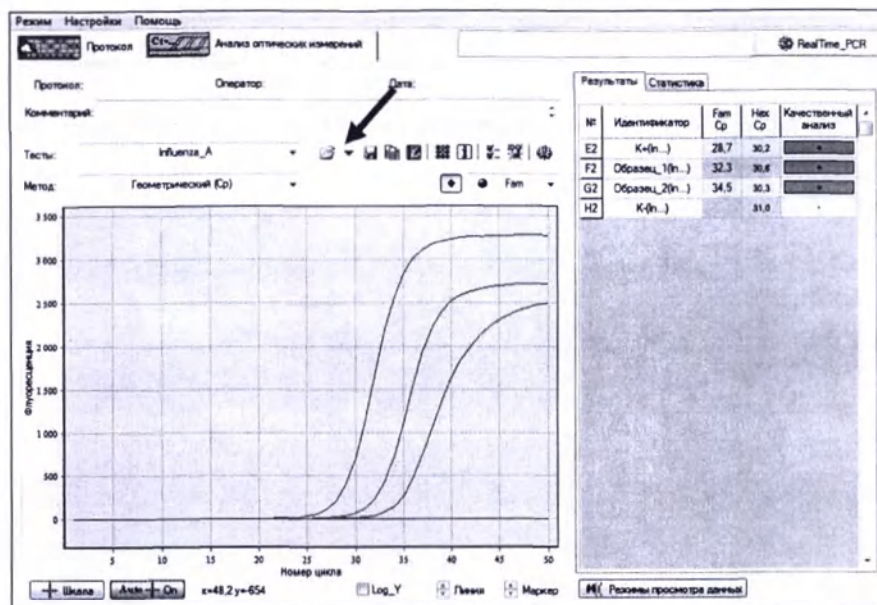
№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0	...	...	Хранение		Хранение

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1** Регистрация результатов амплификации при использовании комплектов реагентов Influenza A virus и Influenza B virus
- 8.1.1 Детекция и учёт результатов осуществляется на детектирующем амплификаторе «ДТ-322», «ДТлайт», «ДТпрайм» или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология») в соответствии с инструкцией к прибору.
- 8.1.2 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента генома вируса гриппа и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками Fam и Hex соответственно. По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.



Для создания лабораторного отчёта следует выбрать «Отчёт» (кнопка).



8.2 Регистрация результатов амплификации при использовании комплекта реагентов Influenza A&B virus

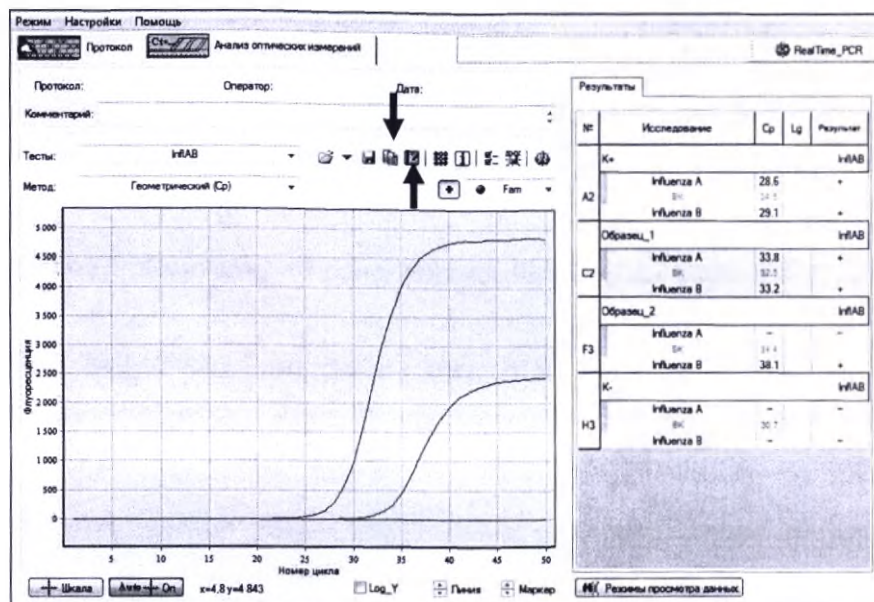
8.2.1 Детекция и учёт результатов осуществляется на детектирующем амплификаторе «ДТлайт», «ДТпрайм» или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология») в соответствии с инструкцией к прибору.

8.2.2 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента генома вируса гриппа А, вируса гриппа В и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками Fam, Rox и Nex соответственно.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчёта следует выбрать «Отчёт» (кнопка ).

Для создания специализированного отчёта следует выбрать «Бланк ответа» (кнопка ).



Результат исследования методом полимеразной цепной реакции

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_2

№	Название исследования	Результаты
1	Influenza A	не выявлено
2	Influenza B	ОБНАРУЖЕНО

Исследование выполнил:

Дата:
Подпись:

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт результатов реакции при использовании комплекта реагентов Influenza A virus

9.1.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих РНК вирусов гриппа А, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих РНК вирусов гриппа А, и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hex (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam отсутствует (Приложение А).

9.2 Учёт результатов реакции при использовании комплекта реагентов Influenza B virus

9.2.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2.2 В биологических образцах, содержащих РНК вирусов гриппа В, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam.

9.2.3 В биологических образцах, не содержащих РНК вирусов гриппа В, и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hex (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam отсутствует (Приложение Б).

9.3 Учёт результатов реакции при использовании комплекта реагентов Influenza A&B virus

9.3.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.3.2 В биологических образцах, содержащих РНК вирусов гриппа А и/или В, детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam и/или Rox.

9.3.3 В биологических образцах, не содержащих РНК вирусов гриппа А и В, и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hex (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам Fam и Rox отсутствует (Приложение В).

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

Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.5 При отсутствии положительного результата (экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам Fam, Rox) в положительном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.6 При получении положительного результата (экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам Fam, Rox) в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения комплектов, входящих в состав набора.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительного контрольного образца, следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается многократное замораживание-оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла.

10.2.2 Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином и положительный контрольный образец следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

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

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 11.2** Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.
- 11.3** Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

ВНИМАНИЕ! В случае вскрытия упаковки набора в боксе она относится к отходам класса Б и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора – 9 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

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

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

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

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

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

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

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001:2015 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485:2016 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-Производственное Объединение ДНК-Технология», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия.

Адрес производителя: ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии набора):

- 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.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов ГриппКомплекс следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14.

тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Приложение В

Таблица В1 - Интерпретация результатов ПЦР при использовании комплекта реагентов Influenza A&B virus

Канал детекции			Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox		
Анализируемые образцы				
Ср не указан	Ср указан	Ср не указан	-	РНК возбудителей не обнаружена
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	+	Обнаружена РНК вируса гриппа А (Influenza А)
Ср не указан	Не учитывается	Ср указан	+	Обнаружена РНК вируса гриппа В (Influenza В)
Ср указан	Не учитывается	Ср указан	+	Обнаружена РНК вирусов гриппа А, В (Influenza А, В)
Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	нд	Результат недостоверный ⁹
Положительный контрольный образец				
Ср указан	Не учитывается	Ср указан	+	Результат положительный
Отрицательный контрольный образец				
Ср не указан	Ср указан	Ср не указан	-	Результат отрицательный

⁹ - требуется перестановка ПЦР или повторное выделение РНК для данного образца, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 5, комн.14.
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
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

Копия на 28 листах верна.

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.





ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов
пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму
A/California/04/2009 ("свиной грипп") методом обратной
транскрипции и полимеразной цепной реакции**

Пан Н1N1

Регистрационное удостоверение:

№ ФСР 2010/07921 от 22 ноября 2016 года

Каталожные номера:

R3-P408-23/4 (пробирки)

R3-P408-S3/4 (стрипы)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1 НАЗНАЧЕНИЕ	3
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	3
2.1 Принцип действия.....	3
2.2 Состав набора.....	5
2.3 Время проведения анализа.....	6
2.4 Число анализируемых проб.....	6
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	9
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	11
7.1 Подготовка материала к выделению РНК.....	11
7.2 Выделение РНК из биологического материала.....	12
7.3 Проведение реакции обратной транскрипции.....	14
7.4 Проведение полимеразной цепной реакции.....	15
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	18
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	19
10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	20
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	21
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	21
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	21
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ	22
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	22
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	23
ПРИЛОЖЕНИЕ	25

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для выявления РНК
вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму
А/California/04/2009 ("свиной грипп") методом обратной
транскрипции и полимеразной цепной реакции**

Пан H1N1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Набор реагентов «Пан H1N1» предназначен для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп") *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в биологическом материале человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки).
- 1.2** Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «Пан H1N1» выпускается в варианте исполнения «ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени».

Вариант исполнения «ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени» (маркируется «Real-time») – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих.

2.1 Принцип действия

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.

В наборе реагентов «Пан H1N1» в пробирки со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

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

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации искомой кДНК и внутреннего контрольного образца, включены флуоресцентные метки Fam и Hex соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вирусов гриппа и внутреннего контрольного образца (таблица 1).

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
Пан Н1N1	ВК	-	-	-

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Исследование с использованием набора реагентов «Пан Н1N1» состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие.

2.2 Состав набора

Набор «Пан H1N1» включает следующие комплекты:

- 1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК)¹ включает:**
 - лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
 - реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
 - промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
 - промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
 - буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
 - отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
 - внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
 - внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).
- 2. Комплект реагентов для обратной транскрипции включает:**
 - буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
 - обратную транскриптазу – 1 пробирка (25 мкл);
 - Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ – 1 пробирка (50 мкл).
- 3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп"), включает:**
 - смесь для амплификации, запечатанную парафином – 48 пробирок (по 20 мкл) или 6 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
 - Taq-полимеразу – 1 пробирка (25 мкл);
 - ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);
 - минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);

¹ - включается в набор по запросу.

- положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
- Крышки для стрипов² – 6 шт.

2.3 Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки) – 5 часов.

2.4 Набор «Пан H1N1» рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность

В образцах биологического материала, содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп"), во время проведения амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительные результаты амплификации специфических фрагментов кДНК (экспоненциальный рост кривой флуоресценции по каналу Fam).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп"), при проведении амплификации, регистрируется положительный результат амплификации внутреннего контроля (экспоненциальный рост кривой флуоресценции по каналу Hex) и отрицательный результат амплификации специфических фрагментов кДНК (отсутствие экспоненциального роста кривой флуоресценции по каналу Fam).

3.2 Чувствительность набора – не более 500 коп/мл.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09

² - в случае использования стрипованных пробирок.

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором следует использовать одноразовые перчатки без талька.

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

Выделение РНК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

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

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

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора в клинко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов «Пан H1N1» требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТ-322, ДТлайт³, ДТпрайм⁴ или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл с RCF не ниже 16 200 × g (соответствует 13 000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17);
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 50 °C до 95 °C;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объёмом 0,5 мл;

³ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

⁴ – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 0,5–10 мкл, 2,0–20 мкл, 20 – 200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;
- комплект для выделения НК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3⁵.
- файл с параметрами анализа «SwineInfluenza.ini».

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют мазки и смывы из полости носа и ротоглотки.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения НК из биологического материала.

6.1 Материал для исследований

Решение о выборе места взятия материала для исследования принимает врач.

⁵ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

6.1.1 Общие требования

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

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

6.1.2 Взятие образцов биологического материала человека

6.1.2.1 Мазки из полости носа

Мазки берут сухим стерильным зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора или транспортной средой для биопроб.

Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Зонд с биоматериалом переносят в пробирку с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удаляют избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

6.1.2.2 Мазки из ротоглотки

Мазки берут сухим стерильным зондом вращательным движением с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки глотки. Зонд помещают в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удаляют избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

6.1.2.3 Смывы из ротоглотки

Перед взятием смывов из ротоглотки проводят предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10-15 с) 8,0-10 мл физиологического раствора стерильного. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования. Смывы из ротоглотки (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.1.2.4 Смывы из полости носа

Взятие материала производят в положении больного сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью зонда или одноразового шприца вводят по 3,0-5,0 мл теплого физиологического раствора стерильного. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования. Смывы (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов.

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования при температуре от 2 °C до 8 °C.

В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка материала к выделению РНК

7.1.1 Мазки и смывы

7.1.1.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).

Примечание – Используйте центрифугу для пробирок объемом 1,5 мл с RCF не ниже 16 200 × g (соответствует 13 000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17).

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

7.2 Выделение РНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект для выделения РНК из биологического материала не входит в состав набора «Пан H1N1».

Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемый комплект для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала: ПРОБА-НК.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения РНК из биологического материала совместно с комплектами для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения одновременно с выделением из биологического материала РНК необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК).

7.2.1 Выделение РНК с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

Примечания

1. Перед началом работы необходимо проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе (ПРОБА-НК). В случае выпадения осадка лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка. Затем перемешать лизирующий раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования.
2. На данном этапе используйте только одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
3. Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец (К-). Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом

1,5 мл внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца и выполните п.п. 7.2.1.1 – 7.2.1.14.

- 7.2.1.1 Добавьте в пробирки с исследуемыми образцами и «К–» по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.
- 7.2.1.2 Плотнo закройте крышки пробирок, встряхните на вортeксе в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортeксе.
- 7.2.1.3 Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.
- 7.2.1.4 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортeксе в течение 3–5 с.
- 7.2.1.5 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.6 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.7 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.2.1.8 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.9 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.10 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.2.1.11 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.12 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.13 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 7.2.1.14 Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения и прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 мин, осадите

конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции.

Полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

7.3 Проведение реакции обратной транскрипции

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 0,5 мл с учётом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).

7.3.2 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С, затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Примечание - В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

7.3.3 В отдельной пластиковой пробирке приготовьте ОТ-смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера;
- 1,0 x (N+1) мкл «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»;
- 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 6. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 7 (6+1) пробирок, т.е. 14 мкл ОТ-буфера + 7 мкл праймеров + 3,5 мкл обратной транскриптазы.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

7.3.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.

7.3.5 Внесите по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки.

7.3.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью (кроме пробирки промаркированной «К-») по 16,5 мкл соответствующего образца РНК (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.3.7 В пробирку, промаркированную «К-», внесите отрицательный контрольный образец, прошедший этап выделения РНК.

Примечание - Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с фильтром.

7.3.8 Пробирки встряхните на вортексе в течение 3-5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.

7.3.9 Пробирки поместите в термостат и инкубируйте при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.

Примечание - Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» (ООО «НПО ДНК-Технология»)).

7.3.10 Осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечания

1. Препарат кДНК допускается хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

2. Для постановки ПЦР образцы кДНК, хранившиеся при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С, необходимо разморозить при комнатной температуре или при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.4 Проведение полимеразной цепной реакции

7.4.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации: по одной для каждого исследуемого образца, отрицательного

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

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 7.

7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Таq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

7.4.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл Таq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+».

Пример: необходимо проанализировать 5 образцов, один «К-» и один «К+». Промаркированных пробирок – 7. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Таq-полимеразы для 8 (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера + 4 мкл Таq-полимеразы.

7.4.4 Перемешайте приготовленную смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Смесь можно хранить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не более одного часа.

7.4.5 Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл перемешанной смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой.

7.4.6 В каждую пробирку добавьте по одной капле (около 20 мкл) минерального масла, плотно закройте пробирки.

7.4.7 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл соответствующего препарата кДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).

- 7.4.8 В пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции.
- 7.4.9 В пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.4.10 Все пробирки центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3-5 с при комнатной температуре.
- 7.4.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «SwineInfluenza.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «Swine_Influenza», укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста «Swine_Influenza» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2 - Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации проводится с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») в соответствии с инструкцией к прибору.

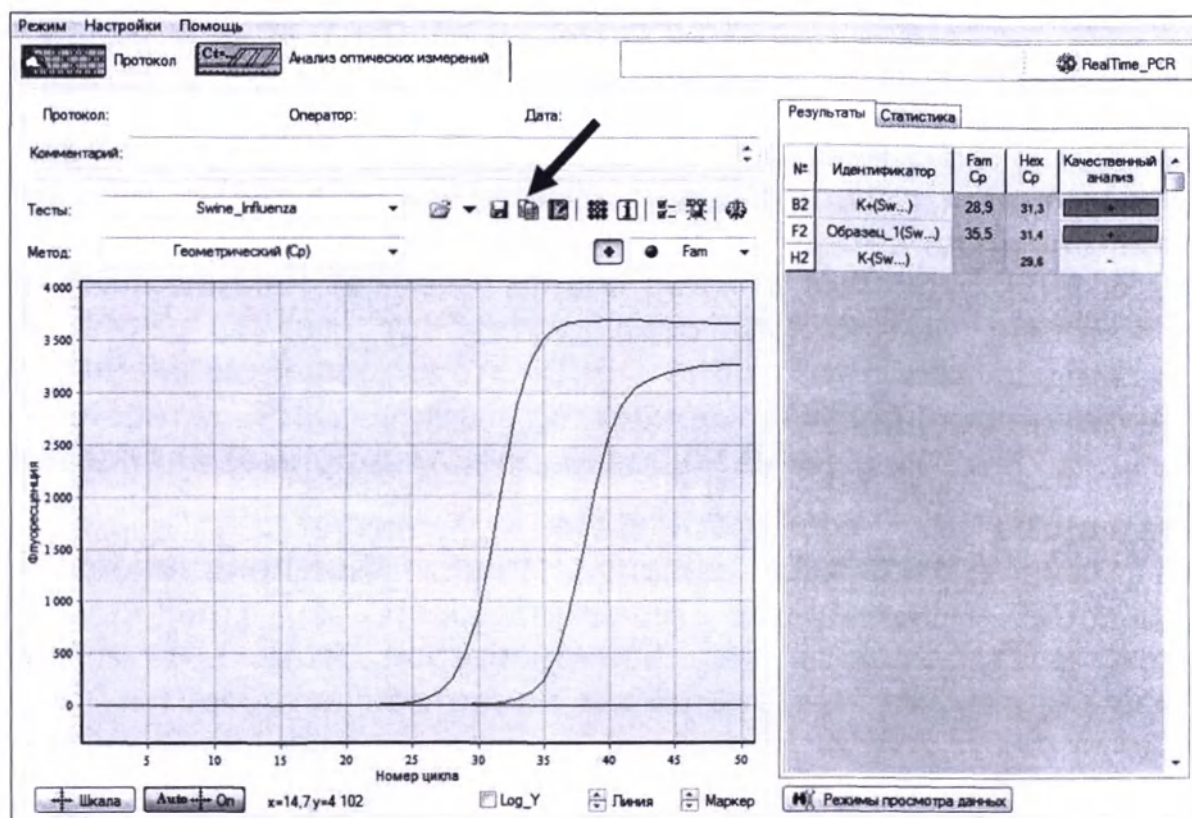
8.2 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчёта необходимо нажать

кнопку «Отчет»





9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1** Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2** В биологических образцах, содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп"), детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam.
- 9.3** В биологических образцах, не содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп"), и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hex (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam отсутствует (Приложение А).
- 9.4** Результат оценивается программой как недостоверный (нд) в случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта (по каналу



Fam) и для внутреннего контрольного образца (по каналу Hex).

Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.5 При отсутствии положительного результата (экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam) в положительном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.6 При получении положительного результата (экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam) в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения комплектов, входящих в состав набора.

10.2 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительного контрольного образца, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается многократное замораживание-оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла

10.3 Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином и положительный контрольный образец следует

хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или холодильниках в течение всего срока годности.

10.4 Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.

10.5 Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

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

11.2 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.3 Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

13.1 Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

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

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

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

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

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

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

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

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001:2015 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485:2016 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-Производственное Объединение ДНК-Технология», ООО «НПО ДНК-Технология» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.

адрес: 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

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.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов «Пан Н1N1», следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, корп.6., тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (звонок по России бесплатный),
+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Номер: 522
2018-05-15

Приложение А

Таблица А1 - Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex		
Анализируемые образцы			
Ср указан	Ср указан/не указан	+	Обнаружена РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп")
Ср не указан	Ср указан	-	РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп") не обнаружена
Ср не указан	Ср не указан	нд	Результат недостоверный ⁶
Положительный контрольный образец			
Ср указан	Ср указан/не указан	+	Результат положительный
Отрицательный контрольный образец			
Ср не указан	Ср указан	-	Результат отрицательный

Примечание – Допустимый разброс по Ср для внутреннего контроля в отрицательных образцах ≤ 2 циклам. Для положительных образцов результат амплификации ВК не учитывается.

⁶ - требуется перестановка ПЦР или повторное выделение РНК для данного образца, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
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

Копия на 26 листах верна.

Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО ИПФ «Литёх»

А.Ю.Наумов

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК
коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР RVI 2

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** предназначен для качественного выявления и дифференциации РНК коронавируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа (типы А, В, подтип А/Н1N1pdm09) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки), взятых у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания, с подозрением на инфекцию COVID-19 или грипп, а также у лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний и не являющихся контактными с больными гриппом или COVID-19.

Функциональное назначение – Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** предназначен для дифференциальной диагностики респираторных инфекций, вызываемых вирусами гриппа и коронавирусом SARS-CoV-2.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** может быть использован для выявления возбудителей гриппа и коронавирусной инфекции.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клинко-диагностических лабораторий не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим образованием, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области молекулярно-биологических методов и методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ИБА) I-IV групп патогенности.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** рассчитан на проведение ОТ-ПЦР - анализа 120 образцов, включая контрольные, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента кДНК, полученной путем проведения обратной транскрипции, методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** выпускается в 2 вариантах исполнения.

Вариант исполнения «Base» содержит реагенты, предназначенные для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Для полного цикла исследования образца

для этапа пробоподготовки производитель рекомендует использовать набор «НК-сорбент» (РЗН 2019/9331).

Вариант исполнения «Express» дополнен комплектом реагентов, предназначенным для экспрессного выделения РНК (с помощью реагента «РНК-ЭКСПРЕСС») из клинического материала, и позволяет проводить весь цикл исследования образца, включающий пробоподготовку и ОТ-ПЦР-анализ.

Таблица 1.

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	«Base»	1. Реакционная смесь SARS-CoV-2/H1N1pdm09 2. Реакционная смесь InflA/B 3. Смесь ферментов 4. Разбавитель 5. ВКО 6. ПКО RVI 7. Раствор для восстановления 8. Раствор ЭКС	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 900 мкл 3 пробирки по 2 мл 1 пробирка - лиофилизат 1 пробирка – 200 мкл 1 пробирка - 2 мл 1 пробирка – 1000 мкл
2	«Express»	<u>Комплект реагентов для выделения РНК:</u> 1. Физиологический раствор 2. РНК-ЭКСПРЕСС <u>Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ</u> 1. Реакционная смесь SARS-CoV-2/H1N1pdm09 2. Реакционная смесь InflA/B 3. Смесь ферментов 4. Разбавитель 5. ВКО 6. ПКО RVI 7. Раствор для восстановления 8. Раствор ЭКС	1 шт. 100 пробирок по 0,5 мл 100 пробирок по 0,2 мл 1 шт. 1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 900 мкл 3 пробирки по 2 мл 1 пробирка - лиофилизат 1 пробирка – 200 мкл 1 пробирка - 2 мл 1 пробирка – 1000 мкл

В состав набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной смеси SARS-CoV-2/H1N1pdm09 входят:

- раствор дНТФ;
- ОТ-ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома *SARS-CoV-2* содержит флуорофор FAM, зонд для специфичного фрагмента генома подтипа *H1N1pdm09* вируса гриппа типа A содержит флуорофор HEX, зонд для внутреннего контроля (искусственная РНК) содержит флуорофор Cy5.

- праймеры для выявления кДНК *SARS-CoV-2* и подтипа *H1N1pdm09* вируса гриппа типа A;
- праймеры для выявления внутреннего контроля (искусственная РНК); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации (ОТ-ПЦР), а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения РНК.

В состав реакционной смеси InflA/B входят:

- раствор дНТФ;
- ОТ-ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома *вируса гриппа типа A* содержит флуорофор FAM, зонд для специфичного фрагмента генома *вируса гриппа типа B* содержит флуорофор HEX, зонд для внутреннего контроля (искусственная РНК) содержит флуорофор Cy5.

- праймеры для выявления кДНК *вирусов гриппа типа A и типа B*;
- праймеры для выявления внутреннего контроля (искусственная РНК); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации (ОТ-ПЦР), а также

тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения РНК.

В состав Смеси ферментов входят:

- Таq-полимераза;
- обратная транскриптаза;
- ингибитор рибонуклеаз;
- дитиотрейтол;
- буфер.

Раствор ЭКС - буфер-активатор реакции амплификации, используется только с образцами РНК, выделенными сорбентным методом.

ПКО RVI представляет собой раствор, содержащий защищенные синтетические рекомбинантные фрагменты кДНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В и ВКО.

ВКО представляет собой защищенный синтетический рекомбинантный фрагмент РНК в бактериофаге MS2.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора.

Паспорт предоставляется по запросу пользователя.

Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru (ГОСТ 51088). На бумажном носителе инструкция предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для определения специфических участков РНК вирусов гриппа и коронавируса *SARS-CoV-2* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

Проведение анализа включает 2 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение РНК термокоагуляционным методом).
2. Проведение обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР амплификации и детекцией результатов в режиме «реального времени», в одной пробирке.

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента РНК вируса путем получения ДНК-копии (кДНК) с РНК-матрицы с помощью реакции обратной транскрипции и накопления (амплификации) копий данного фрагмента ДНК-мишени с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени».

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

4.4. Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК и кДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов, т.е. способность выявлять в исследуемом образце только РНК указанных в назначении микроорганизмов, а также отсутствие неспецифических реакций с РНК и ДНК других микроорганизмов и человека, доказана производителем при исследовании РНК или ДНК следующих микроорганизмов: *коронавируса SARS-CoV-2*, *вируса гриппа типа А подтипа H1N1pdm09*, *вируса гриппа типа В*, *аденовируса 5 типа*, *вируса денге 1*, *Human coronavirus HCoV-HKU1*, *Human coronavirus HCoV-OC43*, *Human coronavirus HCoV-NL63*, *Human coronavirus HCoV-229E*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *HSV 1 и 2 типа*, *CMV*, *метанемовируса человека*, *вируса гриппа типа С*, *энтеровируса*, *вируса паразитина 1-4 типов*, *параэховируса*, *респираторного синцитиального вируса типов А и В*, *Bordetella pertussis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Legionella spp.*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, а также геномной ДНК человека.

Аналитическая специфичность набора реагентов дополнительно проверялась *in silico* со следующими инфекционными агентами: *SARS-CoV*, *MERS-CoV*, *Bacillus anthracis*.

Для анализа использовали он-лайн доступные ресурсы: BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Среди протестированных последовательностей возбудителей, только для SARS-коронавируса показана гомология с фрагментом последовательности участка SARS-CoV-2, составляющая 82%. С такой степенью гомологии вероятность получения перекрестной реакции праймеров крайне мала. С последовательностями других микроорганизмов гомологии не обнаружено.

Проведенный анализ *in silico* указывает на то, что неспецифическая амплификация, которая могла бы привести к получению недостоверных результатов, маловероятна.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были.

Специфичность, рассчитанная как % истинно отрицательных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

5.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** составляет:

- 10^3 геном-эквивалентов/мл для каждого из возбудителей (коронавирус SARS-CoV-2, вирусы гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09) в образце РНК пробы при выделении набором реагентов «НК-сорбент»,

- 10^4 геном-эквивалентов/мл для каждого из возбудителей (коронавирус SARS-CoV-2, вирусы гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09) в образце РНК пробы при выделении реагентом «РНК-ЭКСПРЕСС» в составе набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** вариант исполнения «Express».

Минимальное количество SARS-CoV-2 в 1 мл образцов мазков из носа, носоглотки и/или ротоглотки, которое позволяет выявить набор ПОЛИВИР RVI 2 «Express» с 95% достоверностью, составляет 10^2 TCID₅₀/мл.

5.3. Прецизионность измерения

Внутрисерийная и межсерийная повторяемость набора реагентов для выявления и дифференциации РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией **ПОЛИВИР RVI 2** составила 100%.

5.4. Интерферирующие вещества

Материалом для исследования набором реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение РНК);
- эндогенные интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, избыточное количество примесей в виде слизи, крови в мазках из носа, носоглотки и/или ротоглотки), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата РНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки; такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию;
- экзогенные интерферирующие вещества (например, избыточное количество примесей в виде жиров и углеводов из пищевых продуктов, хлоргексидина в составе лекарственных препаратов местного действия).

При использовании для выделения РНК реагента «РНК-ЭКСПРЕСС» из набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** вариант исполнения «Express» не обнаружено влияния потенциально интерферирующих веществ в клинических образцах в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы и превышающих их в несколько раз, на эффективность выявления коронавируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа типов А и В.

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки	кровь	5%
	слизь	5%
	хлоргексидин биглюконат	2%
	пищевые продукты	5%
	никотин	1 мкМ

При использовании для выделения РНК набора реагентов НК-сорбент не обнаружено влияния потенциально интерферирующих веществ в клинических образцах в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы и превышающих их в несколько раз, на эффективность выявления коронавируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа типов А и В.

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки	кровь	10%
	слизь	60%
	хлоргексидин биглюконат	2%
	пищевые продукты	50%
	никотин	6 мкМ

Для контроля качества тестируемой РНК и присутствия возможных ингибиторов в наборе реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** предусмотрено тестирование внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью специальных праймеров, входящих в состав реакционных смесей (см. п. 4.1 Инструкции). По окончании реакции амплификации наличие сигнала по каналу Cy5 (сигнал выявления внутреннего контроля), свидетельствует о качестве тестируемого образца нуклеиновых кислот. Сигнал выявления внутреннего контроля не должен превышать конечный цикл, указанный в инструкции к ПЦР-набору. Отсутствие или снижение эффективности сигнала ВКО после проведения ПЦР свидетельствует о ненадлежащем качестве образца для исследования и требует повторной пробоподготовки.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностическая чувствительность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2 - 100 % (114 положительных образцов, интервал 97,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления РНК вируса гриппа типа А - 100 % (93 положительных образца, интервал 96,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления РНК вируса гриппа типа В - 100 % (78 положительных образцов, интервал 96,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления РНК вируса гриппа типа А подтипа H1N1pdm09 - 100 % (38 положительных образцов, интервал 92,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2 - 100 % (265 отрицательных образцов, интервал 98,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гриппа типа А - 100 % (286 отрицательных образцов, интервал 99,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гриппа типа В - 100 % (301 отрицательный образец, интервал 99,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гриппа типа А подтипа H1N1pdm09 - 100 % (341 отрицательный образец, интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3.

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 обязаны обеспечивать безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные,
- При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.
- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области молекулярно-биологических методов и методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп патогенности.
- не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях.

Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение РНК из исследуемого материала

- Комплект реагентов для выделения РНК из состава набора **ПОЛИВИР RVI 2** (для варианта исполнения «**Express**») или Набор реагентов «**НК-сорбент**» (РУ № РЗН 2019/9331) (для варианта исполнения «**Base**»);
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 мкл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой;
- холодильник для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;

2-й этап - проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с детекцией результатов

- Комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ из состава набора **ПОЛИВИР RVI 2** вариант исполнения «**Express**» или набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** вариант исполнения «**Base**»;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- амплификатор нуклеиновых кислот термоциклический с детекцией сигнала в реальном времени, например Термоциклер CFX96 Touch, «Bio-Rad», США, ФСЗ 2008/03399;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов; *
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 или 2,0 мл для приготовления амплификационной смеси.
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб (мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и Временными методическими рекомендациями по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденными Главным государственным врачом Российской Федерации 21.01.2020.

Для экспресс-анализа с помощью реагента «РНК-ЭКСПРЕСС» мазок из носа, ротоглотки или носоглотки берется с помощью тупфера с флок-тампоном из дакрона или полиэстера. Рекомендуется делать забор как минимум двух образцов от одного пациента: из одного образца проводится экстракция генетического материала для проведения исследования, второй является запасным на случай проведения повторного анализа. Данная методика рассчитана на тупферы **без транспортной среды**. По вопросам использования транспортных сред обращайтесь к производителю набора реагентов.

Материал должен быть доставлен в лабораторию как можно скорее, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике, при +2...+8°C. Носоглоточные и орофарингеальные тампоны могут быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки.

Допускается хранение образцов при +2...+8°C не более 2-х суток.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

При использовании набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** комплектации «Express» для полного цикла исследования обработка клинического материала (мазки из носа, носоглотки и ротоглотки) для экспрессного выделения РНК, а также его хранение производится согласно данной инструкции (п.10.1-2).

При использовании набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** комплектации «Base» для подготовки образцов РНК использовать набор реагентов для пробоподготовки с сорбентной очисткой нуклеиновых кислот «НК-сорбент» (РЗН 2019/9331). В этом случае для выделения РНК необходимо при экстракции вместе с исследуемым образцом внести 5 мкл восстановленного ВКО (п.10.1) из набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2**. Параллельно с клиническими образцами проводят пробоподготовку **отрицательного контрольного образца (ОКО)**, используя в качестве исследуемого образца деионизованную воду или физиологический раствор. Анализ полученных образцов РНК и ОКО проводить с п.10.3.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА¹

10.1. Подготовка компонентов к проведению анализа, для всех вариантов исполнения.

Перед первым использованием набора необходимо восстановить образец ВКО!

10.1.1 Пробирку с лиофилизированным образцом ВКО (внутренним контрольным образцом) кратко центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для позиционирования содержимого на дне пробирки.

10.1.2. Добавить в нее 650 мкл Раствора для восстановления.

10.1.3. Растворять не менее 10 минут, периодически перемешивая на вортексе.

Приготовленный таким образом ВКО использовать в процедуре экстракции РНК. Хранить восстановленный ВКО при температуре +2...+8 °C в течение 6-ти месяцев. Не замораживать!

10.2. Процедура выделения РНК, для варианта исполнения «Express».

10.2.1. Подготовка образцов к экстракции РНК с использованием Комплекта реагентов для выделения РНК.

¹ Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru, на бумажном носителе предоставляется по запросу пользователя.

10.2.1.1. Приготовить и промаркировать необходимое количество пробирок с Физиологическим раствором (в соответствии с количеством проб биоматериала плюс одну для отрицательного контроля выделения).

10.2.1.2. Поместить в подготовленную пробирку с физиологическим раствором рабочую часть зонда с ватным тампоном, вращать зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора.

10.2.1.3. Вынуть зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить зонд и закрыть пробирку. Зонд утилизировать в соответствии с утвержденными процедурами с использованием дезинфекционных средств на основе хлора.

10.2.1.4. В пробирку отрицательного контроля выделения внести 50 мкл очищенной воды (в комплект набора не входит).

Выделение РНК проводится из образцов в физиологическом растворе. Образцы использовать в течение 2-х часов для выделения РНК. Допускается хранение проб биологического материала в физиологическом растворе при -18...-25 °С не более 2-х недель. Допускается однократное размораживание материала.

ОБРАЗЕЦ ИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА ДОЛЖЕН БЫТЬ МАКСИМАЛЬНО БЫСТРО ПЕРЕНЕСЕН В «РНК-ЭКСПРЕСС».

10.2.2. Выделение РНК с использованием Комплекта реагентов для выделения РНК.

10.2.2.1. Приготовить и промаркировать полипропиленовые пробирки с реагентом «РНК-ЭКСПРЕСС», равное числу пробирок из п. 10.2.1.1.

10.2.2.2. Внести в подготовленные пробирки по 5 мкл ВКО.

10.2.2.3. Внести в подготовленные пробирки по 200 мкл:

- в пробирки для исследуемых образцов - исследуемые образцы (п. 10.2.1.3.);

- в пробирку ОКО – отрицательный контроль выделения (п. 10.2.1.4.);

10.2.2.4. Вortexировать пробирки в течение 10 секунд, скинуть капли коротким центрифугированием.

10.2.2.5. Установить пробирки в термостат и инкубировать 15 минут при 95°C.

10.2.2.6. Центрифугировать пробирки 1 минуту при 10 - 12 тыс.об./мин на центрифуге.

Полученный супернатант содержит РНК.

ВНИМАНИЕ! ПОСЛЕ ЭКСТРАКЦИИ РНК С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТА «РНК-ЭКСПРЕСС» НЕОБХОДИМО НЕМЕДЛЕННО ВНЕСТИ ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ В АМПЛИФИКАЦИОННУЮ СМЕСЬ, МАКСИМАЛЬНО В ТЕЧЕНИЕ 15 МИНУТ!

Пробирку с выделенной РНК немедленно заморозить. Допускается хранение образцов при -18...-20 °С не более 2-х недель.

10.3. Подготовка к проведению амплификации с обратной транскрипцией, для всех вариантов исполнения.

10.3.1. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционными смесями и разбавителем тщательно перемешать.

10.3.2. Приготовить и промаркировать 2 одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл или 2,0 мл для приготовления амплификационных смесей.

10.3.3. Из компонентов набора приготовить две рабочие амплификационные смеси:

1 - с Реакционной смесью SARS-CoV-2/H1N1pdm09, 2 - с Реакционной смесью InflA/B из расчета на 1 пробу:

Таблица 2.

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	17,5
Реакционная смесь	7,0

После добавления Смеси ферментов, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием и осадить капли с крышки пробирки.

10.3.4. Приготовить бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации по количеству образцов, включая контрольные, для двух рабочих смесей.

Маркировка пробирок на крышке недопустима!

10.3.5. Внести в соответствующие пробирки по 28 мкл приготовленных амплификационных смесей.

10.3.6. В пробирки с амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы:

ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ «РНК-ЭКСПРЕСС» (Комплектация «Express»):

- в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – 7 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего процедуру выделения;

- в пробирки исследуемых образцов – 7 мкл исследуемых образцов;

- в пробирку положительного контрольного образца (ПКО) – 7 мкл ПКО RVI.

ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «НК-СОРБЕНТ» (Комплектация «Base»):

- в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – 3,5 мкл раствора ЭКС и 3,5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего процедуру выделения;

- в пробирки исследуемых образцов – 3,5 мкл раствора ЭКС и 3,5 мкл исследуемых образцов;

- в пробирку положительного контрольного образца (ПКО) – 7 мкл ПКО RVI.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

10.4. Проведение амплификации.

10.4.1. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.4.2. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующей программе:

+42 °C	25 мин	
+95 °C	5 мин	
+95 °C	10 сек	5 циклов
+60 °C	25 сек	
+72 °C	30 сек	
+95 °C	10 сек	
+60 °C	25 сек (считывание по каналам FAM, HEX, Cy5)	40 циклов
+72 °C	30 сек	

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **ПОЛИВИР RVI 2**, представлены в таблице 3 для амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» «CFX 96» (BioRad).

Таблица 3.

Параметр	Канал флуоресценции		
	FAM	HEX	Cy5
<i>Analyze Data from Cycle 5 to 40</i>			
<i>«Base»line Setting – Apply Fluorescence Drift Correction</i>			
<i>«Base»line threshold</i>	100	100	20

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

11.2. Интерпретация результатов

Мишени, детектируемые по используемым каналам флуоресценции, для реакционной смеси **SARS-CoV-2/H1N1pdm09** представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Канал	Канал HEX	Канал FAM	Канал Cy5
Мишень	фрагмент генома подтипа вируса гриппа A/H1N1pdm09	фрагмент генома SARS-CoV-2	Внутренний контроль, искусственная РНК

Мишени, детектируемые по используемым каналам флуоресценции, для реакционной смеси **InflA/B** представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Канал	Канал HEX	Канал FAM	Канал Cy5
Мишень	фрагмент генома вируса гриппа типа B	фрагмент генома вируса гриппа типа A	Внутренний контроль, искусственная РНК

Интерпретация результатов анализа с целью выявления РНК коронавируса **SARS-CoV-2**, вирусов гриппа типов А, В, подтипа А/Н1N1pdm09 проводится в соответствии с таблицей 6.

Для положительных образцов важно убедиться, что кривая накопления флуоресцентного сигнала имеет характерную S-образную форму, в противном случае образец считается отрицательным.

11.3. Предупреждения

Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования коронавирусом **SARS-CoV-2** и вирусами гриппа и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решений о лечении пациентов.

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

Тест не определяет наличие коронавируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа, если их концентрация ниже заявленной аналитической чувствительности.

Таблица 6.

	Ct FAM	Ct HEX	Ct Cy5	Результат
ПКО	< 25 по всем каналам			Реакция прошла
	НЗ или > 25 по любому из каналов			Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО	НЗ	НЗ	< 30	Специфическая контаминация отсутствует.
	НЗ	НЗ	> 30	Ингибирование или недостаточное выделение РНК.
	< 40 по любому из каналов		любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.
Анализируемый образец	< 35 по любому из каналов		любой	ПРИСУТСТВИЕ РНК соответствующего возбудителя
	> 35, но < 40 по любому из каналов		< 30	Возможно присутствие РНК соответствующего возбудителя. Рекомендуется провести повтор анализа данного образца, начиная с этапа выделения РНК. Выделение РНК следует проводить сорбентным методом, используя второй тупфер от пациента, либо аликвоту из пробирки с физиологическим раствором, оставшуюся в п. 10.2.1.3. Анализ с помощью ОТ-ПЦР следует проводить в трех повторностях. При повторной регистрации указанных значений Ct образец считается положительным
	НЗ	НЗ	< 30	ОТСУТСТВИЕ РНК соответствующих возбудителей.
	НЗ	НЗ	> 30	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца, начиная с этапа выделения РНК. Выделение РНК следует проводить сорбентным методом, используя второй тупфер от пациента, либо аликвоту из пробирки с физиологическим раствором, оставшуюся в п. 10.2.1.3.

Примечание: НЗ – нет значения (значение N/A).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** варианта исполнения «**Base**» должен храниться при температуре -18...-20 °С в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев.

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** варианта исполнения «**Express**» содержит комплекты, которые должны храниться при разном температурном режиме, при хранении набор необходимо разуккомплектовать:

1) Комплект реагентов для выделения РНК должен храниться при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности. Срок годности комплекта – 6 месяцев.

2) Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ должен храниться при температуре -18...-20 °С в течение всего срока годности. Срок годности комплекта – 6 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов (кроме восстановленного ВКО). Восстановленный ВКО хранить строго при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности,

указанного на этикетке.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов **ПОЛИВИР RVI 2** транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств). Условия транспортирования набора и его комплектов должны соответствовать условиям хранения!

Допускается транспортировка набора реагентов во всех вариантах исполнения при температуре +2...+8 °С в течение трех суток (не более).

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клиничко-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 1-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение РНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **ПОЛИВИР RVI 2**, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

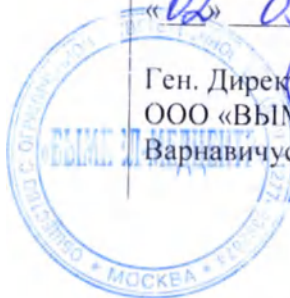


П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 13 ЛИСТОВ

«02» 03 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМЦЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
_____ шт.

Директор
Наумов А.Ю.

