

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS/COVID-19¹ методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» по ТУ 21.20.23-089-05664012-2020.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» предназначен для выявления (без дифференцировки) РНК коронавирусов SARS и COVID-19 методом, основанным на обратной транскрипции (ОТ) и последующей амплификации кДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме реального времени в образцах биоматериала, полученного при взятии мазка из носа, носоглотки и/или ротоглотки, промывные воды бронхов, полученные при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж), (эндо)трахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, биопсийный или аутопсийный материал легких, цельная кровь, сыворотка, моча.

Диагностическая роль набора реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» заключается в возможности его использования для ранней диагностики коронавирусов SARS и COVID-19, для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика коронавирусов SARS и COVID-19, эпидемиологический мониторинг.

Набор реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» может быть использован для диагностики коронавирусов SARS и COVID-19 (без накопления возбудителя вирусологическими методами) в учреждениях медицины и здравоохранения, вирусологических лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, в эпидемиологических службах, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности, а также в стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами II группы патогенности².

¹ COVID-19 (corona virus disease 2019), официальное название, рекомендованное Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) от 11.02.2020. Ранее временно использовалось название 2019-nCoV.

² В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 4 реагентов.

№	Состав набора	Описание	Объем (мл)	Кол-во
1.	Реагент-1	прозрачная бесцветная жидкость	1,90	1 пробирка
2.	Реагент-2	прозрачная бесцветная жидкость	0,10	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
4.	Отрицательный контрольный образец, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

В состав набора входит эксплуатационная документация: инструкция по применению набора и паспорт.

Реагент-1 расфасован по 1,90 мл в микропробирку вместимостью 2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: 2х-кратный буфер для ОТ-ПЦР-PV, олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентный зонд, очищенная вода.

Реагент-2 расфасован по 100 мкл в микропробирку вместимостью 0,5 до 2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. БиоМастер-Микс (25×), состав: M-MuLV-RN ревертаза и HS-Тақ ДНК-полимераза в буферном растворе.

Положительный контрольный образец ПКО расфасован по 150 мкл в микропробирку объемом 1,0-2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: раствор рекомбинантных бактериальных плазмид в ТЕ-буфере, содержащих вставки ДНК, комплементарные участкам генома коронавирусов SARS и 2019-nCoV.

Отрицательный контрольный образец расфасован по 150 мкл в микропробирку объемом 1,0-2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: очищенная вода.

эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами", утвержденным постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Набор реагентов упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой. Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку. В этом случае пакет и инструкцию по применению вкладывают в коробку.

П р и м е ч а н и е - Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига, составляющая 60 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на проведение 100 определений, включая контроли.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот коронавирусов SARS и COVID-19 основано на использовании метода ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Метод основан на многократном увеличении числа копий фрагмента вирусных нуклеиновых кислот (комплементарной ДНК – кДНК), что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации.

2.4 Ограничения метода

В инфицированном материале РНК вирусов может быть не обнаружена по причине, если титр (концентрация) вируса составляет менее 10^4 копий/мл.

В инфицированном материале РНК вирусов может быть не обнаружена по причине ингибирования обратной транскрипции, ПЦР и/или недостаточной эффективности выделения нуклеиновых кислот. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения НК либо проведения реакции ПЦР. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР и/или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью положительных контрольных образцов ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской области) в рамках исследования эффективности набора.

3.1.1 Аналитическая чувствительность

Набор реагентов должен выявлять в реакционной смеси 10^2 копий (2×10^4 копий/мл) рекомбинантных плазмид, содержащих вставки ДНК, комплементарные участкам генома коронавирусов SARS и COVID-19.

3.1.2 Аналитическая специфичность

Набор реагентов не должен давать положительных результатов с образцами здоровых доноров или образцами, содержащими генетический материал гетерологичных вирусов (вирус гриппа типа А, В, парагриппа 1-4, риновирус человека, аденовирус 5 типа, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), метапневмовирус человека, вирус денге 1).

3.2 Диагностические характеристики

Исследования диагностических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской области) и в испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва) в рамках исследования эффективности набора и проведения технических испытаний.

При проведении исследований наблюдалась 100 % внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех исследуемых образцов.

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность – 100 % (98,1 % – 100 %) с доверительной вероятностью 95 % (200/200).

При исследовании 50 положительных образцов, содержащих генетический материал коронавируса COVID-19 и 150 положительных образцов, из которых 50 образцов содержат генетический материал коронавируса SARS и 100 образцов содержат вирус SARS (штамм Frankfurt 1) положительный результат в ПЦР получен для всех 200 образцов³.

3.2.2 Диагностическая специфичность⁴

³ Исследования проведены на модельных образцах, содержащих генетический материал коронавируса COVID-19. Клинический материал, содержащий коронавирус COVID-19, не был исследован.

⁴ Не валидировано на образцах с инфекционными возбудителями: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type B, *Legionella pneumophila*, а также иные возбудители бактериальных респираторных инфекций нижних дыхательных путей.

Диагностическая специфичность – 100 % (98,1 % – 100 %) с доверительной вероятностью 95 % (200/200).

При исследовании 200 отрицательных образцов, содержащих НК гетерологичных вирусов: вирус гриппа типа А (субтипов Н1, Н3, Н5, Н7, Н9), В, парагриппа 1-4, риновирус человека, аденовирус 5 типа, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус денге 1 отрицательный ответ в ПЦР получен во всех 100 % случаях.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Коронавирусы SARS и COVID-19 отнесены к II группе патогенности. Работа с вирусами должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности», СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Все работы по отбору проб от больных, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводятся в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности и Временными методическими рекомендациями по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденными Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 21.01.2020 г.

Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные;
- инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала

в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов (без накопления возбудителя вирусологическими методами) в учреждениях медицины и здравоохранения, вирусологических лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора необходимо участие специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности, не имеющих медицинских противопоказаний к вакцинации, лечению специфическими препаратами и к работе в средствах индивидуальной защиты. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

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

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

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

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Амплификатор Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96 (BioRad, США).

Приборы должны быть зарегистрированы в РФ как медицинское изделие.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

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

5.4 Другое используемое оборудование

- ПЦР-бокс (БАВ-ПЦР «Ламинар-С» («Ламинарные системы», Россия) или аналогичный другого производителя).
- Центрифуга для микропробирок до 12000 об/мин.
- Встряхиватель пробирок «Вортекс».
- Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл.
- Морозильная камера от минус 15 до минус 25°C.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

Наконечники с аэрозольным барьером.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (Рег. № ФСР 2008/03147), производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия.

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

- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл.

- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл.

- Отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки.

- Комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность коронавирусами SARS и COVID-19, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» и осуществляется в соответствии с Временными методическими рекомендациями по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденными Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 21.01.2020 г.

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: респираторного материала (мазок из носоглотки и ротоглотки у амбулаторных пациентов и мокрота (при наличии) и/или эндотрахеальный аспират или бронхоальвеолярный смыв у пациентов с более тяжелыми респираторными заболеваниями), цельной крови (сыворотки крови), мочи, аутопсийного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Процедура взятия проб должна выполняться в соответствии с правилами противоэпидемиологического режима: При выделении РНК из клинического материала (сыворотки крови, мочи, биопсийного и аутопсийного материала), проведении ПЦР и

детекции продуктов амплификации следует руководствоваться требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», 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 санитарным врачом Российской Федерации 21.01.2020 г.

В качестве проб для диагностического исследования используют:

- респираторный материал: мазок из носоглотки и ротоглотки у амбулаторных пациентов и мокрота (при наличии) и/или эндотрахеальный аспират или бронхоальвеолярный смыв у пациентов с более тяжелыми респираторными заболеваниями);

- кровь (сыворотка крови);

- моча;

- для посмертной диагностики используют аутопаты легких, трахеи и селезенки.

Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость.

Сразу после взятия пробы пробирки маркируют, указывая фамилию и инициалы больного, возраст, день болезни, вид материала, дату и время его взятия. Остальные сведения о больном (предполагаемый диагноз, дату поступления, клинические симптомы и соответствующий анамнез пациента (включая терапию, полученные эпидемиологические данные, в т.ч. зарубежные поездки в течение 21 суток до появления признаков заболевания, факторы риска) и пр. указывают в сопроводительной документации).

После завершения сбора образцов от больного (больных) все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Выделение РНК из клинических образцов осуществляют при соблюдении требований МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и Временных методических рекомендаций по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденных Главным государственным

санитарным врачом Российской Федерации 21.01.2020 г. Работа по выполнению стадии выделения РНК проводится в помещениях с классом биозащиты BSL-3 с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» в соответствии с инструкцией производителя набора.

Полученную РНК используют для проведения анализа с помощью набора реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG».

В соответствии с инструкцией производителя очищенные РНК можно хранить до 24 ч при температуре от 2 °С до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения РНК используют комплект реагентов «РИБО-преп» в соответствии с инструкцией производителя набора. Для достижения показателей аналитической чувствительности объем аликвоты исходного материала (пробы) должен составлять не менее 100 мкл.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

При сборе клинического материала необходимо учитывать влияние интерферирующих веществ (эндогенных и экзогенных), которые могут встречаться в клинических образцах и ингибировать выделение РНК, тем самым снижая эффективность реакции обратной транскрипции (Kovarova M., Draber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Res 2000 Jul 1; 28(13)).

- Эндогенные факторы: гемоглобин (концентрация в крови ~ 160 мг/мл) при проведении ПЦР уменьшает выход при концентрации в реакционной смеси >1 мг/мл, мочевины (в моче ~350 мМ), в среднем, начинает ингибировать при >20 мМ.
- Экзогенные факторы: гепарин (ингибирует ПЦР при концентрации более 0,15 Ед./мл, не устраняется органическими растворителями и переосаждением).

Сведения о других интерферирующих веществах, при условии соблюдения правил взятия и предварительной подготовки исследуемого материала, указанных в инструкции, отсутствуют.

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке;
- вязкая мокрота (вязкую по консистенции мокроту перед исследованием разбавляют физраствором).

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследуемые пробы хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 2 суток, при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С не более одного месяца, при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года, не допуская его оттаивания до проведения исследования.

При замораживании клинического материала его транспортировка также должна проводиться в замороженном состоянии. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов.

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие коронавирусов SARS и COVID-19, должны осуществляться в соответствии с действующими СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», санитарными правилами СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» и Временными методическими рекомендациями по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденными Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 21.01.2020 г.

Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.7.2790-10) и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

7.1 Процедура приготовления реакционной смеси

Приготовление реакционной смеси: в отдельной микропробирке объемом 1,5 мл готовят смесь компонентов следующего состава (из расчета на одну пробу):

Реагент-1 19 мкл

Реагент-2 1 мкл

Смесь перемешивают пипетированием. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0,5-10, 2-20 и 20-200 мкл.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

Реагент-1 19 мкл

Реагент-2 1 мкл

На каждый анализ расходуются:

- 5 мкл ПКО;

- 5 мкл ОКО;

8.2 Последовательность проведения этапов анализа

8.2.1 ПЦР-амплификация

Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника, размораживают. Перед использованием встряхивают пробирки с реагентами на микроцентрифуге-вортекс и осаждают капли на дно пробирки кратковременным центрифугированием в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

Для проведения амплификации используют прозрачные микропробирки объемом 0,2 мл в соответствии с количеством исследуемых образцов.

Помещают микропробирки в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки.

Готовят реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешивают в отдельной пробирке (из расчета на одну пробу):

Реагент-1 19 мкл

Реагент-2 1 мкл

Открывают крышки микропробирок и вносят в них по 20 мкл реакционной смеси.

Используя наконечники с аэрозольным барьером, в микропробирки последовательно вносят соответственно маркировке образцов 5 мкл ОКО, и затем по 5 мкл растворов РНК исследуемых образцов, закрывают крышки данных микропробирок. Вносят (в последнюю очередь) 5 мкл ПКО и закрывают крышки данных микропробирок.

Общий (конечный) объем реакционной смеси в каждой пробирке должен составить 25 мкл.

Перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

Внимание! После смешивания компонентов микропробирки сразу устанавливают в амплификатор и запускают реакцию.

а) При использовании прибора роторного типа (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)) задают следующие параметры в соответствующих диалоговых окнах:

- ротор 36-луночный;
- объем реакционной смеси – 25 мкл;
- температурно-временные режимы:

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Измерение флуоресценции	Количество циклов
45	20:00		1
95	05:00		1
95	00:10		45
60	00:20	Green/FAM	

После чего запускают программу амплификации и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора.

б) При использовании прибора планшетного типа (например, CFX 96 (BioRad, США)) задают следующую программу амплификации:

Внимание! Следует избегать нанесения маркировки на крышки микропробирок, помещенных в амплификатор.

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Измерение флуоресценции	Количество циклов
45	20:00		1
95	05:00		1
95	00:10		45
60	00:20	Green/FAM	

8.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

ПЦР в режиме реального времени и регистрацию результатов проводят в приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), CFX 96 (BioRad, США).

а) Для приборов роторного типа (Rotor Gene Q)

Анализ результатов амплификации РНК коронавирусов SARS/COVID-19 проводят по каналу FAM/Green:

1) нажать в меню кнопку «Analysis» в открывшемся окне выбрать «Cycling A Green» и затем «Show». В появившемся окне включить вкладки «Dynamic Tube» и «Slope Correct»;

2) На вкладке «Outlier Removal» установить параметр на 20 %. В окне Threshold установить значение пороговой линии 0,02;

3) в таблице результатов (окно «Quant. Results»/Количественные Результаты) появятся значения Ct.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла "Ct" в соответствующей графе в таблице результатов).

б) Для приборов планшетного типа (CFX 96)

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла "Ct" в соответствующей графе в таблице результатов).

Результат подлежит учету в случае:

а) появления пересечения кривых флуоресценции с пороговой линией на канале FAM/Green в пробах с положительными контрольными образцами (ПКО);

б) отсутствия положительного сигнала на канале FAM/Green в пробах с отрицательными контрольными образцами (ОКО).

Результат считать положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имеет характерную «сигмовидную» форму и пересекает пороговую линию. При этом значение Ct для данного образца должно быть менее 35. Амплитуда сигнала при этом не имеет значения.

Результат считать отрицательным, если значение Ct на канале FAM/Green отсутствует. Если значение Ct больше 35, то ОТ-ПЦР необходимо повторить и считать положительным в случае повторения результата или при значении Ct меньше 35.

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения амплификации, гибридизации и учета результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителями приборов.

Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» хранить в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с ТУ 21.20.23-089-05664012-2020 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Хранение набора реагентов должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, с ежедневной регистрацией температуры.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с ТУ 21.20.23-089-05664012-2020 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С в термоконтейнере. Допускается транспортирование при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере в течение не более 3 суток. Набор реагентов, транспортируемый с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев⁵ со дня изготовления предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

Наборы с истекшим сроком годности, вскрытые, но не использованные наборы, а также наборы с поврежденной упаковкой, утилизируют по классу А, как

Не верифицировано данными исследования в режиме реального времени

эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

10.5 Гарантийные обязательства производителя

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

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» в течение срока годности направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, Россия, Новосибирская область, рабочий поселок Кольцово, тел. (383) 336-60-10, факс(383) 336-74-09 e-mail: vector@vector.nsc.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Зав. лабораторией особо опасных
вирусных инфекций
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

 С.А. Боднев

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

 М.П. Богрянцева

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус



13 02 2020 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ МИ
Набора реагентов для выявления
РНК коронавирусов SARS/ COVID-19¹ методом ПЦР
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
(«Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG») по ТУ 21.20.23-089-05664012-2020
на базе (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

Клинические испытания проведены в лабораторных условиях с применением музейных тест-штаммов из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116) и клинических образцов поступивших из региональных Центров Гигиены и Эпидемиологии.

При клинических испытаниях МИ «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» на 200 положительных образцах (100 на 2-х сериях набора реагентов), из которых 50 образцов (25 на 2-х сериях набора реагентов), содержали генетический материал коронавируса 2019-nCoV (pAL2-T/2019-nCoV) в концентрации 1×10^4 копий/мл, 50 образцов (25 на 2-х сериях набора реагентов) содержали генетический материал коронавируса SARS (pJET 1.2/SARS) в концентрации 1×10^4 копий/мл, 100 образцов (50 на 2-х сериях набора реагентов) содержали вирус SARS (штамм Frankfurt 1) был получен положительный результат в 100 % случаев (200 проб из 200 заведомо положительных).

При клинических испытаниях МИ «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG» на 200 отрицательных образцах (100 на 2-х сериях набора реагентов), не содержащих генетический материал коронавирусов SARS и COVID-19, содержащих гетерологичные вирусы: вирус гриппа типа А субтипа Н1, штамм A/17/Калифорния/2009/38 (NOVEL) H1N1 (4 образца мазков из полости носоглотки), вирус гриппа типа А субтипа Н3, штамм A/Novosibirsk/02/2013(H3N2) (4 образца мазков из полости носоглотки), вирус гриппа типа А субтипа Н5, штамм A/chicken/Kurgan/05/2005/ (2005) H5N1 (4 образца мазков из полости носоглотки), вирус гриппа типа А субтипа Н7 штамм A/equine/Detroit/3/1964(H7N7 (4 образца мазков из полости носоглотки), вирус гриппа типа А субтипа Н9 штамм A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018 H9N2 (4 образца мазков из полости носоглотки), аденовирус типа 5 штамм AD-GP (4 образца культуральной суспензии клеток Vero), вирус денге -1 штамм DENV-1/RUS/TH (4 образца культуральной суспензии клеток Vero), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-CoV) штамм hCoV-EMC/2012 (4 образца культуральной суспензии клеток Vero), вирус гриппа типа В штамм B/Chita/01/2010 (4 образца культуральной суспензии клеток Vero), риновирусов человека (3 образца риновирусов человека [С (изолят RhV-NSC-14/2012), А (изолят RhV-NSC-08/2011), А (изолят RhV-NSC-11/2012)], респираторно-синцитиальный вирус (PCV штамм Long) (4 образца мазков из полости носоглотки), вирус парагриппа 1-4 типа (6 клинических образцов мазков из ротоглотки), вирус гриппа типа А (2 клинических образца мазков из ротоглотки), вирус гриппа типа В (1 клинический образец мазка из ротоглотки), респираторно-синцитиальный вирус (1 клинический образец мазка из ротоглотки), метапневмовирус (1 клинический образец мазка из ротоглотки), а также 4

¹ Официальное название коронавируса COVID-19 (corona virus disease 2019), рекомендованное Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) от 11.02.2020. Ранее временно ему было присвоено название 2019-nCoV.

образца мазка из полости носоглотки, 4 образца мазка из полости ротоглотки, 4 образца мокроты, 4 образца эндотрахеального аспирата, 4 образца сыворотки крови, 4 образца мочи, 4 образца аутоптата легких, 4 образца аутоптата трахеи, 4 образца аутоптата селезенки, 10 образцов ДНК человека отрицательный ответ получен в 200 пробах (100 % случаев).

Таким образом, в ходе клинических испытаний с использованием 200 положительных образцов (100 на 2-х сериях набора реагентов), содержащих генетический материал коронавируса 2019-nCoV (pAL2-T/2019-nCoV) (25 на 2 сериях набора), содержащих генетический материал коронавируса SARS (pJET 1.2/SARS) (25 на 2 сериях набора), содержащих вирус SARS (штамм Frankfurt 1) (50 на 2-х сериях набора реагентов) и на 200 отрицательных образцов (100 на 2-х сериях набора реагентов), содержащих гетерологичные вирусы: вирус гриппа типа А (субтипов H1, H3, H5, H7, H9), В, парагриппа 1-4, риновирус человека, аденовирус 5 типа, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус денге 1 доказана диагностическая эффективность МИ «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG»:

Диагностическая чувствительность – 100 % (98,1 % – 100 %) с доверительной вероятностью 95 % 200/200.

Диагностическая специфичность – 100 % (98,1 % – 100 %) с доверительной вероятностью 95 % 200/200.

Представитель Руководства по качеству,
Заведующая отделом биологического
и технологического контроля
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»



М. П. Богрянцева

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 19 ЛИСТОВ

« 13 » 12 2010 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавицус П.К.



В данном Документе
проставлено, но,
пронумеровано и закреплено
печатью 19 листов
Девятнадцать
прописью
Зав. Отдел
должность, подпись

П.К. Варнавицус