

УТВЕРЖДАЮ

Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ»

Минобороны России

С.В. Борисевич

«25» февраля 2020 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора реагентов для выявления РНК коронавируса
2019-nCoV методом полимеразной цепной реакции в реальном времени
(ПЦР-РВ-2019-nCoV)»

ТУ 20.59.52-014-08534994-2020

2020

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

«Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ-2019-nCov)» по ТУ 20.59.52-014-08534994-2020.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) РНК коронавируса 2019-nCoV в препаратах НК, выделенных из проб, полученных 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 заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфической патологии (тяжелой острой респираторной инфекции - COVID-19) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА).

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, тяжелой острой респираторной инфекции – COVID-19, специфическая индикация патогенных биологических агентов. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения.

Показания

Выявление РНК 2019-nCoV методом ПЦР проводится пациентам с клинической симптоматикой респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную 2019-nCoV, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам (см. Временные методические

рекомендации профилактики, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV) утв. Минздравом России, Роспотребнадзором.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 5 реагентов.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-nCov	сухое вещество белого цвета	—	6 стрипов по 8 микропробирок
2.	Разбавитель, РБ	прозрачная бесцветная жидкость	0,8 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-nCov	сухое вещество белого цвета	—	3 пробирки
4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл	1 пробирка

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 58 °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 48 определений, включая контрольные образцы.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот коронавируса 2019-nCoV основано на использовании метода одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) в одной микропробирке.

При амплификации с помощью ОТ-ПЦР-РВ используют два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена *orf1ab* генома коронавируса 2019-nCoV, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих нуклеиновые кислоты (НК) внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ (виртуальная последовательность не встречающаяся в природе), два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих НК внутреннего положительного контроля выделения (виртуальная последовательность не встречающаяся в природе), а также три флуоресцентных зонда (FAM, R6G и Cy5). Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени. Постановка ОТ-ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (BioRad, США), Rotorgene, ДТ прайм 4М1 или эквивалентных по характеристикам (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Данный набор реагентов реализует преимущества мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в части одновременного выявления в одной пробе РНК коронавируса 2019-nCoV, а также двух контролей анализа по разным каналам детекции флуоресценции. Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: **FAM** – внутренний положительный контроль выделения РНК; **R6G** – коронавирус 2019-nCoV; **Cy5** – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК коронавируса 2019-nCoV. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вируса 2019-nCoV.

2.4 Ограничения метода

Для выделения РНК используют наборы реагентов с известными характеристиками в отношении интерферентов, зарегистрированные в установленном порядке («РИБО-преп», ФСР 2008/03147).

При проведении исследований по интерференции с использованием реагентов «Lypochek Assayed Chemistry Control Level 2» (Био-Рад, США), «ABX Diffitrol» трех уровней (Horida Medical, Франция) и набора («РИБО-преп»), влияния интерферентов на функциональные характеристики набора не выявлено.

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

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

Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования коронавирусом 2019-nCov 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 2019-nCov, если его концентрация ниже заявленной аналитической чувствительности ($1,0 \times 10^3$ копий·мл⁻¹).

При возникновении сомнений относительно правильности положительного результата анализа, проверку соответствия функциональных характеристик набора реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov» проводят методом секвенирования. С этой целью осуществляют амплификацию препарата НК,

полученного из пробы с сомнительным результатом, с помощью олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении фрагмента гена *orf1ab* генома коронавируса 2019-nCoV с координатами, перекрывающими 5327-5515 по референсной последовательности NC_045512.2 (Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome). Получить аликвоты праймеров возможно по месту производства медицинского изделия - ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России: Московская обл. Сергиево-Посадский р-н, Сергиев Посад-6 г-к. 141306, ул. Октябрьская, д. 11, (496) 552-12-06, Email: 48cnii@mil.ru. Полученный ПЦР-продукт секвенируют методом Сенгера.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.1 Чувствительность.

Чувствительность – не более $1,0 \times 10^3$ копий РНК в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹). Для достижения данного показателя рекомендуется использование наборов реагентов для выделения НК, допускающих отбор аликвот исходного материала (пробы) объемом не менее 100 мкл.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов НК респираторных инфекций: вирусы тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), гриппа типа А H1N1, H5N1 и В, респираторно-синцитиальный вирус (PCV), аденовирусы, *Coxiella burnetii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type В, *Legionella pneumophila*, *Metapneumovirus*, *Human respirovirus 1*, *Rhinovirus* (14 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

При проведении исследований наблюдалась 100 % внутримышечная, межмышечная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические исследования набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ Вектор (р.п. Кольцово, Новосибирской области). Диагностические чувствительность и специфичность оценивались при анализе 160 проб образцов клинического материала, контаминированных штаммом вируса 2019-nCoV (SARS-CoV-2) в количестве 0,1 lg TCID₅₀/мл ($1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл), а также 100 образцов клинического материала от пациентов с иной этиологией респираторного заболевания (грипп А и В, парагрипп, аденовирусная инфекция, респираторно-синцитиальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека, вызванная hCov NL63, hCov OC43, hCov 229E, hCov HKU1), с использованием разных серий испытуемого набора на четырех разных амплификаторах.

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Мазки со слизистой носа, носоглотки и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж/промывных вод бронхов, аспират эндотрахеальный и назофарингиальный, мокрота, аутопсийные образцы цельная кровь, сыворотка крови, моча	100% (97.7% -100.00%)	100% (96.5% -100.00%)

Результаты анализа 160 образцов клинического материала, контаминированных штаммом вируса 2019-nCoV (SARS-CoV-2) в количестве 0,1 lg TCID₅₀/мл ($1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл), проанализированных при различных контролируемых переменных: на разных базах (лабораториях), двумя разными операторами, с использованием разных серий испытуемого набора, на четырех разных амплификаторах, полностью совпали. Воспроизводимость и повторяемость медицинского изделия составили 100 %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

SARS-CoV-2 (ранее 2019-nCoV) - новый вид коронавирусов, вызывающий опасное инфекционное заболевание COVID-19, относится к II группе патогенности.

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

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность коронавирусом 2019-nCoV проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), методических указаний «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09), временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» (Временные МР 2019-nCoV), а также «Временных методических рекомендаций по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

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.

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалиста с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА I-II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборанта со средним специальным медицинским образованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». 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

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) – «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (BioRad, США), Rotorgene, «ДТ прайм 4М1».

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, 10-100 мкл и на 20-200 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);

штатив типа «IsoFreeze»;

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

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

холодильник на 2-8 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

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;

набор реагентов для выделения ДНК/РНК (например «РИБО-преп», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ФСР 2008/03147);

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

6.1 Тип исследуемых образцов

Биологическим материалом для исследования являются: материал, полученный при взятии мазка из носа, носоглотки и/или ротоглотки, промывные воды бронхов, полученные при фибробронхоскопии (бронхоальвео-лярный лаваж), (эндо)трахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, биопсийный или аутопсийный материал легких, цельная кровь, сыворотка, моча. Основным видом биоматериала для лабораторного исследования является мазок из носоглотки и/или ротоглотки.»

6.2 Процедура получения биологического материала

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ забор проб осуществляют в соответствии с требованиями временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» (Временные МР 2019-nCoV).

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения НК используют зарегистрированные наборы реагентов (например «РИБО-преп», производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ФСР 2008/03147). Для достижения необходимой чувствительности рекомендуется использование наборов реагентов для выделения НК допускающих отбор аликвот исходного материала (пробы) объемом не менее 100 мкл. Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov».

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

Для контроля выделения нуклеиновых кислот используют пробирку с **ВПК-В-РНК** из состава набора реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov». 10 мкл **ВПК-В-РНК** добавляют в пробирку с пробой непосредственно после этапа лизиса. Регистрация роста сигнала по каналу **FAM** свидетельствует об успешном выделении РНК.

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию и его хранение до проведения исследований проводят в соответствии с требованиями временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» (Временные МР 2019-nCoV) и "Временных методических рекомендаций по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)" (таблица 2).

Таблица 2 – Условия транспортирования и хранения биоматериала.

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспортировка	Условия хранения до тестирования	Комментарии
Мазок с носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков <*>	4 °C	<= 5 дней: 4 °C > 5 дней <*>: -70 °C	Носоглоточные и орофарингеальные тампоны должны быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер	4 °C	<= 48 часов: 4 °C > 48 часов <*>: -70 °C	Возможно (небольшое разведение образца)
Эндотрахеальный аспират, аспират носоглотки или смыв из носа	Стерильный контейнер	4 °C	<= 48 часов: 4 °C > 48 часов <*>: -70 °C	
Мокрота	Стерильный контейнер <*>	4 °C	<= 48 часов: 4 °C > 48 часов <*>: -70 °C	Убедитесь, что материал поступает из нижних дыхательных путей
Ткани биопсии или аутопсии, включая легкие	Стерильный контейнер с физиологическим раствором <*>	4 °C	<= 24 часа: 4 °C > 24 часа <*>: -70 °C	
Сыворотка (две пробы: острая фаза и через 2 - 4 недели после острой фазы)	Пробирки, для разделения сыворотки (взрослые: собирают 3 - 5 мл цельной крови)	4 °C		Острая фаза - первая неделя болезни, выздоравливающий - от 2 до 3 недель и позже
Цельная кровь	Пробирка	4 °C	<= 5 дней: 4 °C > 5 дней <*>: -70 °C	Для обнаружения антигена, особенно в первую неделю болезни
Моча	Контейнер для сбора мочи	4 °C	<= 5 дней: 4 °C > 5 дней <*>: -70 °C	

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя тяжелой острой респираторной инфекции COVID-19, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

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).

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления контрольных образцов

Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС-nCov– в пробирки с сухим содержимым РС-nCov вносят по 15 мкл РБ. Готовый препарат подлежит немедленному использованию в текущем анализе.

Разбавитель, РБ – готов к использованию.

Положительный контрольный образец, ПКО-nCov – в пробирку с сухим содержимым ПКО-nCov добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Хранение разведенных препаратов ПКО-nCov допускается при температуре не выше минус 20°C в течение срока годности набора реагентов.

Раствор для разбавления ПКО, ОКО – готов к использованию.

Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК – готов к использованию.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ проводят в рабочей зоне 3, не подразумевающей контакта с биоматериалом (МУ 1.3.2569-09).

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

- одна микропробирка с **PC-nCov**;
- 15 мкл **РБ**.

На каждый анализ расходуются:

- 20 мкл **ПКО-nCov**;
- 20 мкл **ОКО**.

8.2 Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводится в один этап:

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;
- вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 1 и вводят красители **FAM** (Green), **R6G** (HEX, Yellow) и **Cy5** (Red);

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	50 °C – 900 секунд	1
2	95 °C – 300 секунд	1
3	95 °C – 10 секунд	50
4	58 °C – 10 секунд Считывание сигнала флуоресценции	
5	72 °C – 20 секунд	

- вводят сведения об образцах по всем красителям и активируют прибор в соответствии с руководством по эксплуатации. Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Green – 4, Yellow – 8, Red – 8.

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

- набор реагентов извлекают из холодильника, РБ и ОКО перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;

- помещают микропробирки в стрипах (PC-nCov) в штатив для стрипов типа «IsoFreeze»* и маркируют в соответствии с протоколом исследования;

- открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл РБ;

- используя наконечники с аэрозольным барьером, последовательно вносят в микропробирки соответственно порядку исследования образцов по 20 мкл ОКО, ОКО-В и далее по 20 мкл растворов исследуемых образцов в необходимой повторности**, закрывают крышки данных микропробирок;

- вносят в микропробирки соответственно маркировке по 20 мкл ПКО-nCov, закрывают крышки данных микропробирок;

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

ВНИМАНИЕ! После смешивания PC-nCov, разбавителя и препарата РНК, микропробирки сразу установить в амплификатор и запустить ОТ-ПЦР-РВ.

Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования и прикрывают крышки микропробирок;

- закрывают крышку прибора, запускают реакцию ОТ-ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора, расчетное время анализа составляет в среднем 1,5 часа.

*Примечание: До начала работы штатив рекомендуется охладить в холодильнике до температуры 2-8 °С

**Примечание: каждый образец рекомендуется анализировать в двух повторях.

8.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (BioRad, США), Rotorgene, ДТ прайм 4М1 (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции (регистрация роста сигнала, рисунок 1) означает любую величину порогового цикла C_t менее 50. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается программой прибора, например, как величина порогового цикла ($C_t \geq 50$ в приборах АНК), либо как ее отсутствие (N/A в приборах фирмы BioRad) и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

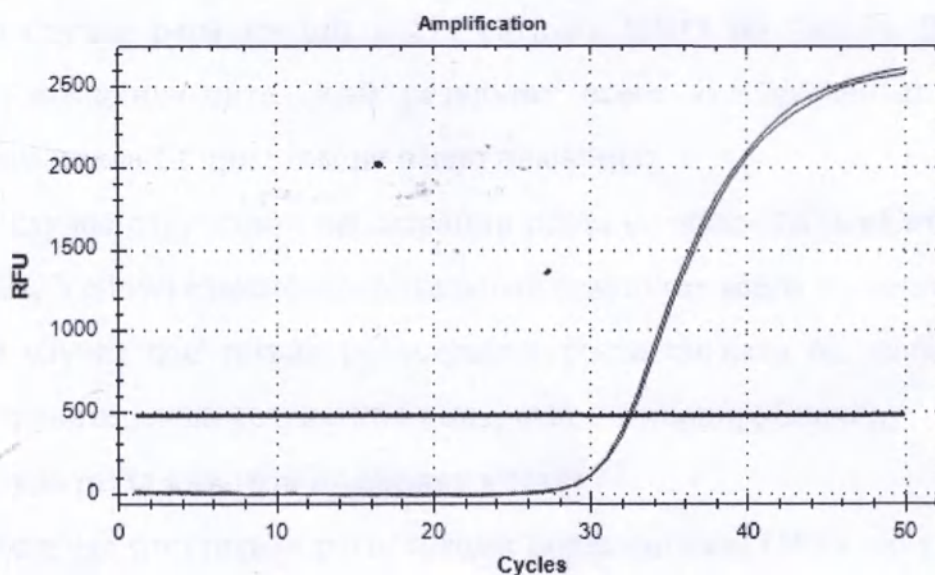


Рисунок 1 - Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу HEX (CFX-96)

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **R6G** (HEX, Yellow) относительно отрицательного контроля означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов НК коронавируса 2019-nCoV в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в случае отсутствия положительной динамики по каналу **R6G** (HEX, Yellow) означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном

прохождении реакций ОТ и ПЦР-РВ, и подтверждает отсутствие специфических фрагментов НК коронавируса 2019-nCoV в данной микропробирке.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **FAM** (Green) в случае отсутствия положительной динамики по каналу **R6G** (HEX, Yellow) означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, и дополнительно подтверждает отсутствие специфических фрагментов НК коронавируса 2019-nCoV в данной микропробирке.

Учет результатов анализа

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала **ОКО** по каналу **R6G** (HEX, Yellow) (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО-nCov** по каналу **R6G** (HEX, Yellow) (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала по каналу **Cy5***** (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ОКО** по каналу **R6G** (HEX, Yellow);
- в случае регистрации роста сигнала по каналу **Cy5*****, с любой величиной порогового цикла C_t ;
- в случае регистрации роста сигнала **ПКО-nCov** по каналу **R6G** (HEX, Yellow), с любой величиной порогового цикла C_t .

***Примечание: в пробирках, имеющих регистрацию роста сигнала по каналу **R6G** (HEX, Yellow) с пороговым циклом реакции менее 30,0, допускается отсутствие регистрации роста сигнала либо низкая амплитуда кинетической кривой по каналам **Cy5** (Red) и **FAM** (Green).

Регистрация роста сигнала по каналу **R6G** (HEX, Yellow) в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома коронавируса 2019-nCoV. Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала по каналу **Cy5** (Red)*** с пороговым циклом Ct менее 37,0 свидетельствует об успешном прохождении обратной транскрипции и ПЦР-РВ в каждой конкретной микропробирке, большие значения Ct свидетельствуют о некотором ингибировании ОТ-ПЦР-РВ.

В случае добавления **ВПК-В-РНК** на этапе выделения НК:

- регистрация роста сигнала по каналу **FAM** (Green) с пороговым циклом менее 35,0, свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, большие значения Ct свидетельствуют о некоторых потерях на этапе выделения РНК.

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Интерпретация результатов анализа проб с помощью набора реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov»

Результат ПЦР по каналу			Образец	Интерпретация
FAM (Green)	R6G (HEX, Yellow)	Cy5 (Red)		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев				
—	—	—	ПКО	Ложноотрицательный результат , ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
любой	+	любой	ОКО-В	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК
	+		ОКО	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ОТ-ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы				
—	—	—	проба	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
—*	—	+		Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов				
—	+	любой	ПКО	Набор реагентов специфичен в отношении РНК коронавируса 2019-nCoV
++	—	+	ОКО-В	Контаминация отсутствует
—	—	+	ОКО	
++	—	+	проба	В пробе не обнаружена РНК коронавируса 2019-nCoV
любой	+	любой		В пробе присутствует РНК коронавируса 2019-nCoV
*Примечание: в случае добавления ВПК-В-РНК на этапе выделения НК				

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например программа АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 2.0 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

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

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov» должно производиться в соответствии с ТУ 20.59.52-014-08534994-2020 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре до плюс 20 °С.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем^{1****}. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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 в рабочую зону 4-1 либо специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10.

¹ **** Не верифицировано данными исследования в режиме реального времени.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как 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 «ПЦР-РВ-2019-nCov» направлять на предприятие-изготовитель ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России: Московская обл. Сергиево-Посадский р-н, Сергиев Посад-6 г-к. 141306, ул. Октябрьская, д. 11, (496) 552-12-06, Email: 48cnii@mil.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, 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 ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Временные методические рекомендации профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV) утв. Минздравом России, Роспотребнадзором.
2. Временные методические рекомендации по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
3. Временные методические рекомендации для разработчиков и производителей тестов для выявления коронавируса (SARS-CoV-2).
4. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases Interim guidance 19 March 2020.
5. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19) Interim guidance 19 March 2020.
6. Лабораторное тестирование при подозрении на заражение человека новым коронавирусом 2019 г. (2019-nCoV) Временные рекомендации 17 января 2020 г.
7. Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected, interim guidance, January 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Р.А. Максютлов



В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 23 листов
Двадцать три листа
прописью
Зав. ОТК И.И. Воронков
должность, подпись

Московская обл, Сергиево-Посадский р-н, Сергиев Посад-6 г-к, 141306, ул.Октябрьская, д.11
Тел: (496) 552 12 06 e-mail: 48cnii@mil.ru

ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
ПАСПОРТ КАЧЕСТВА
«ПЦР-РВ-2019-nCoV»

«НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК КОРОНАВИРУСА 2019-nCoV МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ-2019-nCoV)
ПО ТУ 20.59.52-014-08534994-2020»

Серия _____	Наборов в серии _____	Дата изготовления _____	
Пункт ТУ	Наименование показателя	Требования ТУ 20.59.52-014-08534994-2020	Результаты контроля (соответствует/не соответствует/значение полученной величины (по применимости))
1.3	Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 6 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, две пробирки объемом 1,5 мл, четыре пробирки объемом 0,5 мл	Соответствует Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт Состав: 6 стрипов по 8 микропробирок объемом 0,2 мл, две пробирки объемом 1,5 мл, четыре пробирки объемом 0,5 мл
1.5, 1.6	Упаковка и маркировка	Полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), 0,5 и 1,5 мл (с резьбовой крышкой), пакеты для вакуумной упаковки, пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги	Соответствует Полипропиленовые пробирки 0,2 мл (в стрипах), 0,5 и 1,5 мл (с резьбовой крышкой), пакеты для вакуумной упаковки, пакеты типа Zip-lock, этикетки из клеящей бумаги
1.2, табл. 1, п. 1, 2	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, PC-nCov*	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Разбавитель, РБ**	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,8	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость
	Положительный контрольный образец, ПКО-nCov	Сухое вещество белого цвета	Соответствует Сухое вещество белого цвета
	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, pH 8,0	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость, pH
1.2, табл. 1, п. 3	Положительный результат ОТ-ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с любой величиной порогового цикла Ct в пробирках с PC-nCov с ПКО-nCov по каналу R6G. Регистрация роста сигнала с Ct менее 37,0 в пробирках с ПКО-nCov по каналу Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала в пробирках с PC-nCov с ПКО-nCov по каналу R6G. Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 37,0 в пробирках с ПКО-nCov по каналу Cy5
	Отрицательный результат ОТ-ПЦР-РВ	Регистрация роста сигнала с Ct менее 35,0 в пробирках с PC-nCov с ОКО по каналу Cy5; Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО по каналу R6G	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 35,0 в пробирках с PC-nCov с ОКО по каналу Cy5; Отсутствие регистрации роста сигнала в пробирках с ОКО по каналу R6G
	Аналитическая чувствительность	Регистрация роста сигнала в пробирках с PC-nCov с СКО-nCov по каналу R6G Регистрация роста сигнала с Ct менее 35,0 в пробирках с PC-nCov по каналам FAM и Cy5	Соответствует Зарегистрирован рост сигнала в пробирках PC-nCov с СКО-nCov по каналу R6G Зарегистрирован рост сигнала с Ct менее 35,0 в пробирках с PC-nCov по каналам FAM и Cy5

Примечания:

*Содержит дезоксинуклеозидтрифосфаты, специфические праймеры, флуоресцентные зонды, Taq-полимеразу, MMLV-ревертазу, РНК внутреннего положительного контроля, трегалозу для проведения ОТ-ПЦР-РВ.

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

Заключение ОБТК: «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ-2019-nCoV)» серии _____ по своим показателям соответствует требованиям ТУ 20.59.52-014-08534994-2020.

Голен до: _____

Начальник отдела ККВН и ББ



А.Ю. Зверев

Паспорт № _____

« _____ » _____ 202_ г.