



SistemaBioTech

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Система-Биотех»

Позднякова Н.В.



М.П.

21 июня 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2,
вызывающего тяжелую респираторную инфекцию,
в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«SBT-DX-SARS-CoV-2», партия 330-266

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	3
2. НАЗНАЧЕНИЕ	3
3. ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
4. КОМПЛЕКТНОСТЬ И ФОРМЫ ВЫПУСКА	5
5. СОСТАВ	5
6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
9. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ	10
10. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
11. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	11
12. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	11
13. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.....	12
14. КОНТАМИНАЦИЯ.....	16
15. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	17
16. ОЦЕНКА ВЕРОЯТНЫХ СОБЫТИЙ	17
17. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА.....	17
18. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	17
19. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	18
20. СРОК ГОДНОСТИ	18
21. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ И СВЕДЕНИЯ О РЕКЛАМАЦИЯХ.....	18
22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ	19

1. ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы (*Coronaviridae*) – это большое семейство РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать человека и некоторых животных. У людей коронавирусы могут вызвать целый ряд заболеваний – от легких форм острой респираторной инфекции до тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС). В настоящее время известно о циркуляции среди населения четырех коронавирусов (HCoV-229E, -OC43, -NL63 и -HKU1), которые круглогодично присутствуют в структуре ОРВИ, и, как правило, вызывают поражение верхних дыхательных путей легкой и средней степени тяжести.

До 2002 года коронавирусы рассматривались в качестве агентов, вызывающих нетяжелые заболевания верхних дыхательных путей (с крайне редкими летальными исходами). В конце 2002 года появился коронавирус (SARS-CoV), возбудитель атипичной пневмонии, который вызывал ТОРС у людей.

В 2012 году мир столкнулся с новым коронавирусом MERS (MERS-CoV), возбудителем ближневосточного респираторного синдрома, также принадлежащему к роду Betacoronavirus.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус, относится к семейству *Coronaviridae*, относится к линии Beta-CoV B. Вирус отнесен ко II группе патогенности, как и некоторые другие представители этого семейства (вирусы SARS-CoV, MERS-CoV).

С декабря 2019 г. по март 2020 г. наиболее широкое распространение SARS-CoV-2 получил на территории Китайской Народной Республики (КНР), где подтвержденные случаи заболевания были зарегистрированы во всех административных образованиях. Наибольшее количество заболевших выявлено в Юго-Восточной части КНР с эпицентром в провинции Хубэй. 11 марта 2020 года ВОЗ объявила, что вспышка приобрела характер пандемии.

Передача инфекции осуществляется воздушно-капельным, воздушно-пылевым и контактным путями. Ведущим путем передачи SARS-CoV-2 является воздушно-капельный, который реализуется при кашле, чихании и разговоре на близком (менее 2 метров) расстоянии. Контактный путь передачи осуществляется во время рукопожатий и других видах непосредственного контакта с инфицированным человеком, а также через пищевые продукты, поверхности и предметы, загрязненные вирусом. Известно, что при комнатной температуре SARS-CoV-2 способен сохранять жизнеспособность на различных объектах окружающей среды в течение 3 суток.

Заболевание, вызываемое SARS-CoV-2, включено в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих (Постановление Правительства РФ от 31 января 2020 г. № 66).

2. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего тяжелую респираторную инфекцию, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «SBT-DX-SARS-CoV-2» (далее – Набор реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» или Набор) предназначен для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего тяжелую респираторную

инфекцию, методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Функциональное назначение: Набор предназначен для комплексной диагностики РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале человека.

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

Применение Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» не зависит от популяционных и демографических аспектов.

Специфическая патология – коронавирусное заболевание COVID-19, вызванное вирусом SARS-CoV-2.

Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

Потенциальный потребитель - медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Показания к применению:

Необходимость использования в клинической лабораторной диагностике острых респираторных инфекций для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на коронавирусную инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания:

Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот коронавируса SARS-CoV-2 основано на использовании метода реакции обратной транскрипции, протекающей в одной микропробирке с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Для идентификации вирусной РНК с помощью ОТ-ПЦР-РВ используют два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена 3CLpro генома коронавируса SARS-CoV-2, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена «домашнего хозяйства» человека (для одновременно как контроля выделения РНК из биологического образца, полученного от человека, так и контроля прохождения ОТ-ПЦР-РВ), а также два флуоресцентных зонда. 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. Сигналы флуоресценции регистрируются в амплификаторе одновременно и независимо друг от друга по следующим каналам: **FAM** – сигнал от последовательности гена «домашнего хозяйства» человека, **HEX** (или VIC, или JOE, или другой аналогичный по спектральным характеристикам) – сигнал от последовательности гена коронавируса SARS-CoV-2. Эти каналы регистрации флуоресценции являются наиболее используемыми в амплификаторах с детекцией в реальном времени и встречаются в большинстве таких приборов.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК коронавируса SARS-CoV-2. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит РНК вируса SARS-CoV-2.

4. КОМПЛЕКТНОСТЬ И ФОРМЫ ВЫПУСКА

4.1. Комплектность:

- Набор реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» - 1 шт.;
- Паспорт качества – 1 шт.

4.2. Формы выпуска:

Форма выпуска предназначена для синтеза кДНК и проведения амплификации кДНК коронавируса SARS-CoV-2 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Компоненты тест-системы расфасованы в пластиковые пробирки соответствующего объема с закручивающимися крышками. На пробирки с компонентами наклеены этикетки с указанием наименования компонента и его объема в пробирке.

5. СОСТАВ

5.1. В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2». Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

Состав Набора реагентов представлен в таблице 1.

Таблица 1.

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мл	Кол-во
1	Буфер для ОТ-ПЦР-PB	Прозрачная бесцветная жидкость	1,4	3 пробирки
2	БиоМастер-микс	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,35	1 пробирка
3	Флуоресцентный микс С	Прозрачная светло-красная жидкость	1,1	1 пробирка
4	Флуоресцентный микс V	Прозрачная светло-красная жидкость	1,1	1 пробирка
5	ПКО 3CL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
6	Вода	Прозрачная бесцветная жидкость	1,3	1 пробирка

Инструкция по применению входит в состав Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» и поставляется с каждой единицей продукции.

Все компоненты Набора готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

В состав БиоМастер-микса входят ингибитор РНКаз, M-MuLV –RNH ревертаза и HS-Taq (Hot Start Taq – предназначенная для «горячего старта» ПЦР, повышающего специфичность амплификации) ДНК-полимераза.

Буфер для ОТ-ПЦР-PB содержит дезоксинуклеозидтрифосфаты, стабилизаторы и усилители ферментов.

Флуоресцентный микс С содержит фланкирующие ПЦР-праймеры и флуоресцентный зонд, предназначенные для детекции гена «домашнего хозяйства» человека, и служит внутренним контролем для определения эффективности выделения РНК и синтеза кДНК.

Флуоресцентный микс V содержит фланкирующие ПЦР-праймеры и флуоресцентный зонд, предназначенные для детекции гена вируса SARS-CoV-2 путем амплификации фрагмента высоко-консервативного гена коронавируса 3CLpro.

Положительный контрольный образец 3CL (ПКО 3CL) содержит плазмиду с клонированным высоко-консервативным участком гена коронавируса SARS-CoV-2 (3CLpro).

Вода, входящая в состав Набора, свободна от нуклеаз и нуклеиновых кислот и используется при приготовлении реакционной смеси и в качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) при постановке ПЦР.

Примечание: Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига T_a , составляющая 55 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

5.2. Количество анализируемых проб

Набор реagens «SBT-DX-SARS-CoV-2» рассчитан на 400 реакций, включая реакции с контрольными образцами.

ВНИМАНИЕ!!! В состав Набора reagens «SBT-DX-SARS-CoV-2» не входят реактивы для выделения нуклеиновых кислот. Выделение РНК может проводиться с помощью наборов и комплектов, зарегистрированных в установленном порядке на территории Российской Федерации, таких как: «Комплект reagens для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп»» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (РУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019г.).

6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики Набора измерены на испытаниях с использованием амплификаторов CFX96 («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США, ФСЗ 2008/03399), Rotor-Gene 6000 (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), ДТлайт (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, ФСР 2011/10228).

6.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2.

Вид биологического материала	Возбудитель	Комплект reagens для выделения РНК/ДНК	Аналитическая чувствительность ¹⁾ , ГЭ/мл
Мазки со слизистой носоглотки и/или ротоглотки	SARS-CoV ¹ -2	РИБО-преп	1x10 ³

6.2. Аналитическая специфичность

¹⁾ Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

Неспецифических реакций при анализе образцов нуклеиновых кислот следующих микроорганизмов: Influenza A virus (H1N1, H3N2, H7N9), Influenza B virus, аденовирус человека А-5 (штамм Adeno-5), метапневмовирус человека (вирулентный штамм «НМ-1»), вирус парагриппа 1 типа (штамм «Сендай Биомед»), Streptococcus pneumoniae (ССВН-101/14), Haemophilus influenzae (АТСС) и **коронавирус штамма Lp/Ленинград/2/77 (коронавирус, не вызывающий COVID-19)** – не наблюдалось. Таким образом, аналитическая специфичность, рассчитанная как доля образцов, не содержащих НК вируса SARS-CoV-2, правильно идентифицированных как образцы, не содержащие НК вируса SARS-CoV-2, составляет 100 %.

Для исследования аналитической специфичности Набора реагентов использовали препараты нуклеиновых кислот, полученные из охарактеризованных музейных штаммов с биологической активностью не менее $1,0 \times 10^5$ КОЕ/мл (для бактерий) и $1,0 \times 10^5$ БОЕ на мл (для вирусов).

6.3. Воспроизводимость

Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов исследования, проводимого с использованием Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» в разные дни разными операторами, составила 100%.

7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики Набора измерены на испытаниях с использованием амплификаторов CFX96 («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США, ФСЗ 2008/03399), Rotor-Gene 6000 (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), ДТлайт (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, ФСР 2011/10228).

Диагностическую чувствительность определяли при исследовании 30 образцов мазков из носо- и ротоглотки, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19.

Диагностическая чувствительность Набора реагентов 100,0 % (95 % ДИ: 91,1-100 %).

Диагностическую специфичность определяли при исследовании 34 образцов мазков из полости носа и ротоглотки от людей без признаков ОРВИ.

Диагностическая специфичность Набора реагентов 100,0 % (95 % ДИ: 92,2-100 %).

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

8.1. Использовать только для диагностики *in vitro*.

8.2. Потенциальный риск применения Набора реагентов – класс 3.

8.3. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований, изложенных в методических указаниях МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

8.4. Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся ко II группе патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ

с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13 диагностика возбудителей инфекционных болезней II группы патогенности молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-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 (опасности) и возбудителями паразитарных болезней". Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии с 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 с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

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

8.6. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Лабораторный процесс должен быть односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне экстракции, продолжать в Зоне амплификации и детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

8.7. При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР), НЕДОПУСТИМО открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

8.8. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

8.9. Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Класс отходов определяется согласно СанПин 2.1.7.2790-10. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку необходимо утилизировать как отходы класса «Г».

8.10. При каждой операции необходимо использовать и менять одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Одноразовую пластиковую

посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

8.11. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

8.12. Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

8.13. Набор готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

8.14. К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

8.15. Не использовать Набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

8.16. Не использовать Набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

8.17. Не использовать Набор по истечении срока годности.

8.18. Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

8.19. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

8.20. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека: при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

8.21. Набор не содержит: лекарственные средства для медицинского применения, материалы человеческого и животного происхождения, материалы, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8.22. Воздействие внешних факторов на функционирование Набора в диапазоне их возможного изменения при применении Набора в медицинских учреждениях - не существенно, включая электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температуру воздуха.

8.23. Применение Набора 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.

8.24. Применение Набора не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав материала не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

9. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ

9.1. Набор реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» должен применяться согласно инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке.

9.2. Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться специалистами, обученными методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

9.3. Набор должен использоваться при температуре от 15 до 28 °C и относительной влажности воздуха не более 75 %.

9.4. Набор не имеет принадлежностей, медицинских изделий или изделий, не являющихся медицинскими, но предусмотренных для использования в комбинации с Набором.

9.5. Набор не имеет предыдущих модификаций, находящихся в обращении.

9.6. Набор не подлежит калибровке, техническому обслуживанию и ремонту.

10. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

10.1. Бокс с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный), установленный в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

10.2. Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901» или аналогичная).

10.3. Микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903» или аналогичная). (В случае использования стрипованных микропробирок).

10.4. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия, или аналогичный).

10.5. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции, включая каналы FAM ($\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}} - 495 \text{ нм}/520 \text{ нм}$) и HEX ($\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}} - 535 \text{ нм}/556 \text{ нм}$; или канал, схожий с HEX по спектральным характеристикам, например, VIC с $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}} - 538 \text{ нм}/554 \text{ нм}$, или JOE). (Например, CFX96 («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США, ФСЗ 2008/03399), Rotor-Gene 6000 (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), ДТлайт (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, ФСР 2011/10228)). **Эти каналы регистрации флуоресценции являются наиболее используемыми в амплификаторах с детекцией в реальном времени и встречаются в большинстве таких приборов.**

10.6. Штативы для микропробирок для ПЦР и для пробирок объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США или аналогичные). Рекомендуется использование штативов с охлаждением (например, Isofreeze®, США или аналогичных) или льда.

10.7. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- пробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США или аналогичные). (Для приготовления реакционной смеси).

- тонкостенные пробирки для ПЦР (например, «Ахуген», США или аналогичные), совместимые с используемым амплификатором. (Или планшет для ПЦР-РВ).

10.8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром от 1 до 200 мкл (например, «Axygen», США или аналогичные).

10.9. Морозильная камера, поддерживающая температуру в диапазоне от минус 25 до минус 15°C. (Или холодильник с такой морозильной камерой).

10.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

10.11. Емкость для сброса наконечников.

11. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

11.1. Тип биологического материала.

Биологическим материалом для исследования являются мазки из носоглотки и/или ротоглотки.

11.2. Процедура получения, обработки биологического материала и выделения РНК.

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность коронавирусом SARS-CoV-2, не являются частью процедуры анализа с использованием Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2». Пробоподготовка, обработка биологического материала и экстракция РНК проводятся в соответствии с инструкцией по применению комплектов/наборов для выделения РНК, зарегистрированных в установленном порядке на территории Российской Федерации, таких как: «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «Рибо-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (ПУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019г.). Полученный препарат РНК используется для проведения анализа с помощью Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2».

В каждую партию образцов для выделения с помощью комплекта/набора для выделения РНК наряду с исследуемым материалом рекомендуется включать отрицательный контроль выделения РНК (ОКО-В). Для постановки ОКО-В в процедуре выделения РНК вместо одного из образцов биологического материала можно добавлять воду, входящую в состав Набора, или воду другого производства качества не ниже «для молекулярной биологии», свободную от нуклеиновых кислот, РНКаз и ДНКаз. В дальнейшем ОКО-В можно анализировать с помощью Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» вместе с полученными препаратами РНК.

11.3. Материалом для исследования с помощью Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» является РНК, экстрагированная из проб биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность коронавирусом SARS-CoV-2.

12. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

Каждый образец РНК, выделенный из клинического материала, рекомендуется анализировать в двух повторях.

При исследовании образцов РНК, выделенных из исследуемых проб, необходимо в каждом запуске анализировать положительный и отрицательные контрольные образцы:

- ПКО 3CL – положительный контрольный образец;
- Вода, входящая в состав Набора – отрицательный контрольный образец (ОКО).

Также рекомендуется использовать отрицательный контроль выделения РНК (ОКО-В), полученный, как описано в разделе 11.2, в ходе процедуры выделения РНК. (Процедура выделения РНК не является частью процедуры анализа с использованием Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2»).

Объем вносимых контрольных образцов:

- 1 мкл Положительного контрольного образца 3CL;
- 1 мкл воды, входящей в состав Набора, в качестве отрицательного контрольного образца (ОКО).

12.2. Последовательность проведения этапов анализа:

12.2.1. Включить прибор, запустить программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора;

- если прибор использует разные режимы работы в зависимости от типа используемых микропробирок/планшетов, установить нужный;
- ввести параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 3 и установить параметры считывания флуоресценции для красителей FAM и HEX/VIC (или их спектральных аналогов);

Таблица 3.

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	45 °C – 30 мин	1
2	95 °C – 2 мин	1
3	95 °C – 5 сек	45
4	55 °C – 20 сек* Считывание сигнала флуоресценции	

*Примечание: если по каким-то причинам невозможно установить 20 сек (например, при использовании амплификатора QuantStudio 5), можно использовать увеличенный до 25 сек временной интервал.

- внести сведения об образцах и активировать прибор в соответствии с руководством по эксплуатации.

12.2.2. Разморозить реагенты и тщательно перемешать.

12.2.3. Поместить тонкостенные микропробирки для ПЦР в штатив или подготовить планшет, рекомендуется использование штатива с охлаждением или льда. Микропробирки или планшет маркируют в соответствии с протоколом исследования так, чтобы это не мешало считыванию флуоресценции (см. инструкцию к амплификатору). Смешать реагенты согласно таблице 4:

Таблица 4.

Компонент	Объем
2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ	10 мкл
БиоМастер-микс	0,8 мкл
Флуоресцентный микс С	2,6 мкл
Флуоресцентный микс V	2,6 мкл
Препарат РНК	1 мкл (можно также использовать объем от 1 мкл до 4 мкл). Для использования объема препарата РНК, составляющего 5 мкл, рекомендуется использовать таблицу 6.
Вода, входящая в состав Набора	3 мкл (или вариабельный, такой, чтобы общий объем реакционной смеси был 20 мкл)

Для постановки положительного контроля препарат РНК заменяется на 1 мкл Положительного контрольного образца 3CL, при этом добавляется 3 мкл воды, входящей в состав Набора, чтобы общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Для постановки отрицательного контроля препарат РНК аналогичным образом заменяется на ОКО (в качестве ОКО используется вода, которая входит в состав Набора) или ОКО-В (отрицательный контроль выделения РНК, полученный, как описано в разделе 11.2). Общий объем реакционной смеси во всех случаях должен составлять 20 мкл.

При постановке реакции на несколько образцов возможна предварительная подготовка смеси всех реагентов, кроме препарата РНК (или Положительного контрольного образца 3CL, или ОКО, или ОКО-В). Например, на 10 реакций следует смешать реагенты согласно таблице 5, после чего сразу использовать получившуюся смесь для реакции, взяв для каждой микропробирки для ПЦР 19 мкл получившейся смеси и добавив в каждую микропробирку для ПЦР 1 мкл препарата РНК, или Положительного контрольного образца 3CL, или ОКО, или ОКО-В.

При этом в 7 микропробирках для ПЦР будут анализироваться образцы РНК, в одной – Положительный контрольный образец 3CL, в одной – ОКО, в одной – ОКО-В (если последний используется).

Аналогично, с использованием таблицы 5, производится постановка 24, 48 или 96 реакций. Для 20, 30, 40 и т. д. реакций объемы из таблицы 5, предназначенные для 10 реакций, умножаются на 2, 3, 4 и т. д. При этом всегда следует анализировать в одной пробирке Положительный контрольный образец 3CL и в одной – ОКО.

Таблица 5.

Компонент	Объем на 10 реакций, мкл	Объем на 24 реакции, мкл	Объем на 48 реакций, мкл	Объем на 96 реакций, мкл
2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ	104	250	500	1000
БиоМастер-микс	8	20	40	80
Флуоресцентный микс С	27	65	130	260
Флуоресцентный микс V	27	65	130	260
Вода	32	74	148	292

Если пользователю удобнее вносить 5 мкл препарата РНК вместо 1 мкл, реагенты следует смешивать по таблице 6. При этом в микропробирках для ПЦР смешиваются 15

мкл полученной смеси и 5 мкл препарата РНК. Всегда следует анализировать в одной пробирке Положительный контрольный образец 3CL и в одной – ОКО (воду), при этом общий объем реакционной смеси также должен составлять 20 мкл.

Таблица 6.

Компонент	Объем на 10 реакций, мкл	Объем на 24 реакции, мкл	Объем на 48 реакций, мкл	Объем на 96 реакций, мкл
2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ	104	250	500	1000
БиоМастер-микс	8	20	40	80
Флуоресцентный микс С	22	52,5	105	210
Флуоресцентный микс V	22	52,5	105	210

12.2.4. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.

ВНИМАНИЕ! После смешивания компонентов микропробирки сразу установить в амплификатор и запустить ОТ-ПЦР-РВ.

12.2.5. Поместить микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования; закрыть крышку прибора, запустить реакцию ОТ-ПЦР-РВ.

13. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

13.1. Учет результатов анализа.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы, пересекающаяся с пороговой линией, приведенная на рис. 1, означает прохождение амплификации и узнавание образовавшихся фрагментов ДНК соответствующим флуоресцентным зондом. Регистрация положительного сигнала (обозначается в таблице 7 как «+») означает любую величину порогового цикла C_t менее 40. При величине порогового цикла C_t от 40 до 45 результат неопределенный, и тест для этого образца следует повторить. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором (обозначается в таблице 7 как «-») описывается программой прибора как величина порогового цикла (C_t), большая либо равная 45, либо как ее отсутствие (N/A). Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации амплификатора.

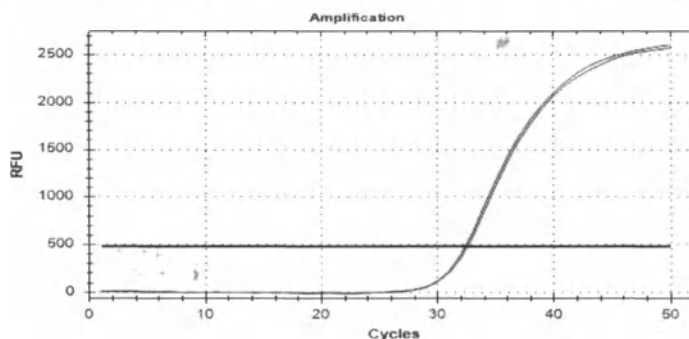


Рисунок 1.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции в пробах по каналу FAM в случае отсутствия положительной динамики по каналу HEX (или VIC, или JOE) свидетельствует об успешном прохождении реакций ОТ и ПЦР-РВ и подтверждает отсутствие специфических фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 в данной пробе.

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу HEX (или VIC, или JOE, используются как взаимозаменяемые) относительно отрицательного контроля свидетельствует о наличии специфических фрагментов НК коронавируса SARS-CoV-2 в данной микропробирке.

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала для ОКО (отрицательный контроль ПЦР) или ОКО-В (отрицательный контроль выделения РНК, см. раздел 11.2) по каналу HEX или VIC (ложноположительный результат всего эксперимента, контаминация). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения. Однако при этом образцы, определенные как отрицательные (демонстрирующие рост сигнала по каналу FAM, но отсутствие роста сигнала по каналу HEX), могут быть зарегистрированы как отрицательные;

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала для ПКО 3CL по каналу HEX или VIC (ложноотрицательный результат всего эксперимента);

- для анализируемых образцов: в случае отсутствия регистрации роста сигнала по каналу HEX (или VIC) при одновременном отсутствии сигнала по каналу FAM (ложноотрицательный результат в конкретной пробе).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала для ОКО и ОКО-В по каналу HEX (или VIC) и FAM;

- в случае регистрации роста сигнала Положительного контрольного образца ПКО 3CL по каналу HEX (или VIC) с любой величиной порогового цикла C_t ;

- для анализируемых образцов: в случае регистрации роста сигнала по каналу FAM с любой величиной порогового цикла C_t .

Для анализируемых образцов регистрация роста сигнала по каналу HEX (или VIC) свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома коронавируса SARS-CoV-2. Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения.

Для анализируемых образцов регистрация роста сигнала по каналу FAM с пороговым циклом C_t менее 37,0 свидетельствует об успешном прохождении ОТ и ПЦР-РВ в каждой конкретной микропробирке, большие значения C_t свидетельствуют о некотором ингибировании ОТ-ПЦР-РВ.

Примечание: в пробирках, имеющих регистрацию роста сигнала по каналу HEX (или VIC) с пороговым циклом C_t менее 30,0, допускается отсутствие регистрации роста сигнала либо низкая амплитуда кинетической кривой по каналу FAM.

13.2. Интерпретация результатов анализа

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7.

Наличие сигнала по каналу		Образец	Интерпретация
HEX или VIC	FAM		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев:			
—	—	ПКО 3CL	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
+	любой	ОКО-В (см. раздел 11.2)	Ложноположительный результат, контаминация в ходе выделения РНК
+	любой	ОКО (вода)	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ОТ-ПЦР-РВ
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы:			
—	—	проба	Ложноотрицательный результат: ингибирование ОТ-ПЦР-РВ, неэффективное выделение РНК из биологических образцов или неэффективный отбор биологического образца
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов:			
+	любой	ПКО 3CL	Набор способен обнаруживать нуклеотидную последовательность коронавируса SARS-CoV-2
—	—	ОКО	Рабочая зона и реагенты свободны от НК, характерных для коронавируса SARS-CoV-2, которые могут давать ложный результат по каналу HEX, и НК гена «домашнего хозяйства» человека, которые могут давать ложный результат по каналу FAM
—	+	проба	В пробе не обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
+	любой		В пробе присутствует РНК коронавируса SARS-CoV-2

14. КОНТАМИНАЦИЯ

РНК коронавируса SARS-CoV-2 не должна выявляться в отрицательном контроле ОКО. Присутствие РНК коронавируса SARS-CoV-2 в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время приготовления образцов или во время подготовки к проведению исследования.

РНК коронавируса SARS-CoV-2 не должна выявляться в отрицательном контроле выделения РНК ОКО-В, если таковой использовался в ходе выделения РНК. Присутствие РНК коронавируса SARS-CoV-2 в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время выделения РНК из биологических образцов.

Для того чтобы избежать контаминации, необходимо произвести полную обработку лаборатории в соответствии с МУ-1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», затем повторно провести анализ.

15. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества Набора при изготовлении осуществляет отдел контроля качества предприятия-изготовителя согласно ТУ 21.20.23-001-16139243-2020.

16. ОЦЕНКА ВЕРОЯТНЫХ СОБЫТИЙ

16.1. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

Специфические воздействия Набора реагентов на организм человека: канцерогенный эффект отсутствует, мутагенное действие отсутствует, репродуктивная токсичность отсутствует.

16.2. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для окружающей среды.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор реагентов безопасен, не является источником загрязнения окружающей среды. Материалы, из которых изготовлены Наборы, не обладают способностью образовывать токсичные соединения в воздушной среде и сточных водах в присутствии других веществ при температуре окружающей среды.

Потенциальная возможность возгорания или взрыва при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности отсутствует.

17. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

17.1. Только для диагностики *in vitro*.

17.2. В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2». Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Наборов реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2».

17.3. Набор реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» не выявляет наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2, если его концентрация в анализируемом образце ниже заявленной аналитической чувствительности 1×10^3 ГЭ/мл.

18. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

18.1. Отрицательные результаты не исключают возможности инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2 и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

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

19. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) данного Набора.

19.1. Условия транспортирования

Транспортирование Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от минус 25°C до минус 15°C.

Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения «холодовой цепи», обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

Наборы, транспортировавшиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

19.2. Условия хранения

Набор реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 25°C до минус 15°C в течение всего срока годности.

Хранение Наборов при указанной температуре должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

20. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Наборы реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2» с истекшим сроком годности применению не подлежат.

21. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ И СВЕДЕНИЯ О РЕКЛАМАЦИЯХ

ООО «Система-БиоТех» гарантирует стабильность Наборов реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2», соответствие основных параметров и характеристик Наборов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации на протяжении всего срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2», а также в случае изменения аналитических характеристик следует обращаться к производителю: ООО «Система-БиоТех», 119034, Москва, Москва, Гагаринский переулок, д. 29, пом. 1, тел./факс: +7 (495) 9256454, info@sistemabiotech.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 и эксплуатации Набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ

	Код партии		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Изготовитель		Использовать до
	Дата изготовления		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Запрет на повторное применение		

В настоящем документе прошито,
пронумеровано и скреплено
печатью



Н. Позднякова лист 06

Генеральный директор ООО
«Система-БиоТех»
Наталья Позднякова