

УТВЕРЖДАЮ
Представитель, действующий по
доверенности № 10/20 от 03.07.2020
ООО «Система-БиоТех»



Позднякова Н. В.

подпись

«09» июля 2020 г.
дата подписи

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2,
вызывающего тяжелую респираторную инфекцию,
в биологическом материале
методом петлевой изотермической амплификации
«SBT-DX-SARS-CoV-2 RNA REAL»

LOT 360-214

Регистрационное удостоверение № _____

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 незначительные 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 не менее опасным новым коронавирусом 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, контаминированные вирусом. Известно, что при комнатной температуре SARS-CoV-2 способен сохранять жизнеспособность на различных объектах окружающей среды в течение 3 суток.

SARS-CoV-2 включен 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 петлевой изотермической амплификации «SBT-DX-SARS-CoV-2 RNA REAL» (далее по тексту – Набор реагентов или Набор) предназначен для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в выделенных из назофарингеальных и/или орофарингеальных мазков препаратах РНК (далее по тексту – образцы) методом петлевой изотермической амплификации.

Функциональное назначение: вспомогательное средство в диагностике *in vitro* (выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2).

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

Применение Набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

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

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Предназначенный пользователь – 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:

Набор реагентов используется для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 у лиц всех возрастов с симптомами ОРВИ либо контактировавших с заболевшим COVID-19, а также у лиц всех возрастов без признаков ОРВИ (в очагах инфекции/ в условиях распространения инфекции) с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

Противопоказания:

Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

Сокращенное наименование медицинского изделия для диагностики *in vitro* – «SBT-DX-SARS-CoV-2 RNA REAL».

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Широко распространенным способом определения наличия или отсутствия инфекционных агентов в биологических образцах человека является специфическая амплификация генетического материала возбудителя инфекции. Петлевая изотермическая амплификация – это метод амплификации нуклеиновых кислот, представляющий собой альтернативу часто используемому методу полимеразной цепной реакции (ПЦР). Принципиальную основу метода составляет способность ДНК-полимеразы I из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* (ДНК-полимераза *Bst*) катализировать реакцию синтеза нуклеиновых кислот с вытеснением цепи. Это исключает необходимость в периодическом повышении температуры реакции для разделения цепей нуклеиновых кислот, как в методе ПЦР.

Отличительными особенностями петлевой изотермической амплификации является проведение реакции при постоянной температуре (обычно 60 – 65 °C), быстрое накопление продуктов реакции (15 – 60 мин), возможность совмещения реакции с обратной транскрипцией, низкая чувствительность к примесям.

Для регистрации ДНК-продуктов амплификации вирусной РНК используется способность флуоресцентного красителя SYBR Green связываться с двуцепочечной ДНК и продуцировать в этом состоянии более сильный сигнал флуоресценции, чем в несвязанном виде.

Подавляющее большинство амплификаторов с детекцией в режиме реального времени имеет канал для регистрации флуоресценции SYBR Green (также обозначается FAM). Таким образом, Набор отличается низкими требованиями к техническому оснащению лаборатории.

Для контроля анализа в Наборе реагентов предусмотрены контрольные образцы: положительный контрольный образец «К+» и отрицательный контрольный образец «К-».

4. КОМПЛЕКТНОСТЬ И ФОРМЫ ВЫПУСКА

4.1. Комплектность:

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

4.2. Форма выпуска:

Форма выпуска предназначена для детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом петлевой изотермической амплификации в препаратах предварительно

выделенной из биологических образцов РНК с оценкой результата путем регистрации флуоресценции в режиме «реального времени». Компоненты тест-системы расфасованы в пластиковые пробирки соответствующего объема. 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 RNA REAL». Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

Состав Набора реагентов представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Комплектность Набора реагентов

Наименование компонента	Количество
«К+» – положительный контроль – прозрачная бесцветная жидкость.	1 пробирка (0,03 мл)
«К-» – отрицательный контроль – прозрачная бесцветная жидкость.	1 пробирка (0,03 мл)
«РС» – реакционная смесь – прозрачная бесцветная жидкость.	3 пробирки по 0,9 мл
«Фермент» – ДНК-полимераза – прозрачная бесцветная вязкая жидкость.	1 пробирка (0,18 мл)

Инструкция по применению входит в состав Набора реагентов и поставляется с каждой единицей продукции.

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

Контрольные образцы «К+» и «К-» используются для контроля проведения реакции петлевой изотермической амплификации при исследовании на выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 в анализируемых образцах.

«К-» (Отрицательный контроль) представляет собой воду, свободную от нуклеаз и нуклеиновых кислот.

«К+» (Положительный контроль) представляет собой раствор, содержащий продукты амплификации целевой последовательности генома коронавируса SARS-CoV-2, которые могут быть далее амплифицированы в реакции петлевой изотермической амплификации (LAMP).

«РС» (Реакционная смесь) представляет собой смесь олигонуклеотидов, специфических к геномной последовательности коронавируса SARS-CoV-2, в необходимом для проведения реакции буферном растворе.

«Фермент» (ДНК-полимераза) представляет собой раствор фермента ДНК-полимеразы в необходимом для проведения реакции буферном растворе.

5.2. Число анализируемых проб.

Набор реагентов рассчитан на анализ 100 образцов, включая контрольные реакции.

6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики Набора измерены на испытаниях с использованием амплификатора CFX96 («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США, ФСЗ 2008/03399).

6.1. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – аналитическая чувствительность Набора

Вид биологического материала	Набор для выделения РНК	Аналитическая чувствительность ¹⁾ , ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки	РИБО-преп	1х10 ⁴

6.2. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность измерялась при анализе образцов нуклеиновых кислот следующих микроорганизмов:

- Вирус гриппа А (Influenza A virus (H1N1))
- Вирус гриппа А (Influenza A virus (H3N2))
- Вирус гриппа А (Influenza A virus (H7N9))
- Вирус гриппа В (Influenza B virus)
- Аденовирус человека А-5 (штамм Adeno-5)
- Метапневмовирус человека (вирулентный штамм "НМ-1")
- Коронавирус (штамм Р/Ленинград/2/77): коронавирус, не вызывающий COVID-19

- Вирус парагриппа 1 типа (штамм "Сендай Биомед")
- Streptococcus pneumonia
- Haemophilus influenza.

Неспецифических реакций не наблюдалось. Таким образом, аналитическая специфичность, рассчитанная как доля образцов, не содержащих РНК вируса SARS-CoV-2, правильно идентифицированных как образцы, не содержащие РНК 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 1,0х10⁵ КОЕ/мл (для бактерий) и 1,0х10⁵ БОЕ на мл (для вирусов).

6.3. Воспроизводимость

Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов исследования, проводимого с использованием Набора реагентов в разные дни разными операторами, составила 100 %.

7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические характеристики Набора измерены на испытаниях с использованием амплификатора CFX96 («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США, ФСЗ 2008/03399) и Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (РУ № ФСР 2008/03147).

Диагностическую чувствительность определяли при исследовании 25 образцов мазков из носо- и ротоглотки от пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19.

Диагностическая чувствительность Набора реагентов 92,0 %.

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

Диагностическую специфичность определяли при исследовании 25 образцов мазков из носо- и ротоглотки от пациентов, отрицательных на SARS-CoV-2.

Диагностическая специфичность Набора реагентов 100,0 %.

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 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, должны 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 амплификации) НЕДОПУСТИМО открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации 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 реакции, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

8.12. Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения 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 клинично-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 на функционирование внешних факторов 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 (если предпринимаются указанные в настоящей инструкции меры по охлаждению реагентов и пробирок для анализа).

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 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 воздуха от 15 до 28 °С 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

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).

Набор электронных или механических дозаторов (пипеток) переменного объема (например, «Ленпипет», Россия, или аналогичный). Диапазоны объемов дозаторов, заявленные производителем, должны включать объемы 8,5 мкл и 1,5 мкл.

Амплификатор с флуоресцентной детекцией, позволяющий нагревать образцы до 65 °С и регистрировать флуоресценцию по каналу SYBR (или FAM; $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}} - 497 \text{ нм}/520 \text{ нм}$) в режиме реального времени.

Штатив изотермический (например, Isofreeze®, США, или аналогичный) или лед и емкость для льда.

Тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, «Ахуген», США или аналогичные, для удобства рекомендуется использование стрипов по 8 или 12 пробирок), совместимые с используемым прибором. (Используются в ходе анализа для проведения реакции петлевой изотермической амплификации).

Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром от 1 до 1000 мкл (например, «Ахуген», США или аналогичные).

ВНИМАНИЕ! При работе с Набором реагентов и анализируемыми образцами необходимо использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку *RNase-free*, *DNase-free*. Для манипуляций с Набором реагентов и анализируемыми образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером.

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

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

Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 25 до минус 15°С.

Костюм для лабораторного персонала и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09. Выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты)

проводится в строгом соответствии с СП 1.3.1285—03 и (или) СП 1.3.2322—08 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Емкость для сброса наконечников.

Дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов, потенциально содержащих вирус SARS-CoV-2.

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 RNA REAL». 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 (РУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.). Полученный препарат РНК используется для проведения анализа с помощью Набора реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2 RNA REAL».

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 («К-»), 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 является РНК, выделенная из проб биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность коронавирусом SARS-CoV-2.

12. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Каждый образец необходимо анализировать в 3 повторах.

Необходимо в каждом запуске теста анализировать положительный и отрицательные контрольные образцы «К+» и «К-».

Для проведения анализа используют амплификатор, позволяющий нагревать образцы до 65 °С и регистрировать флуоресценцию по каналу SYBR (или FAM; $\lambda_{\text{макс.возб.}}/\lambda_{\text{макс.эм.}} - 497 \text{ нм}/520 \text{ нм}$) в режиме реального времени, и микропробирки, совместимые с используемым прибором.

Для проведения анализа с помощью Набора реагентов с использованием амплификатора необходимо подготовить его заранее в соответствии с руководством по эксплуатации. При этом необходимо запрограммировать амплификатор согласно следующей программе:

57 циклов по 20 секунд с измерением флуоресценции на канале SYBR (FAM) каждые 20 секунд (т. е. 19 минут инкубации);

температура 65 °С.

Если амплификатор не позволяет запрограммировать циклы по 20 секунд, то программируются циклы, например, по 30 секунд, при этом все пороговые значения, указанные в разделе 13, пересчитываются соответственно.

Внимание! Если в амплификаторе предусмотрен дополнительный прогрев крышки, то ее необходимо прогреть заранее.

ВНИМАНИЕ! При работе с Набором реагентов и анализируемыми образцами необходимо использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для манипуляций с Набором реагентов и анализируемыми образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером.

ВНИМАНИЕ!!! Во время работы с реагентами необходимо обеспечить их охлаждение путем помещения их в охлажденный штатив (например, штатив изотермический Isofreeze®), на хладоэлемент (аккумулятор холода) или в лед. Для охлаждения «Фермента» настоятельно рекомендуется использовать изотермический штатив или хладоэлемент, охлажденный при -20 °C (пробирку помещают в штатив или на блок хладоэлемента). Не допускайте нахождения «РС» и «Фермента» при комнатной температуре!

Компоненты Набора реагентов разморозить и тщательно перемешать (пипетированием или с помощью 1-2 ударов по стенке пробирки). Если на стенках пробирок после этого остались капли, стряхнуть их на дно энергичным движением руки, держа закрытую пробирку за крышку, или с помощью микроцентрифуги с охлаждением. Поместите реагенты на холод сразу после разморозки!

Подготовить микропробирки в количестве $3 \times n + 2$, где n – число образцов, которые нужно исследовать (каждую пробу обязательно анализируют в 3 повторах; 2 пробирки используют в качестве контрольных).

ВНИМАНИЕ!!! Необходимо поместить микропробирки в изотермический штатив, охлажденный при -20 °C (предпочтительно), или, при отсутствии такового, в лед. Если в процессе работы нарушается режим охлаждения, с высокой вероятностью образуются неспецифические продукты амплификации.

При необходимости промаркировать микропробирки согласно идентификационному номеру исследуемого образца. Каждый образец обязательно анализируется в 3 микропробирках (см. таблицу 4). **ВНИМАНИЕ!** В зависимости от используемого оборудования для проведения анализа надписи следует располагать таким образом, чтобы они не мешали детектированию флуоресцентного сигнала. См. руководство по эксплуатации прибора.

Подготовить смесь «РС» и «Фермента» в отдельной охлажденной пробирке согласно таблице 3, тщательно перемешать (пипетированием или с помощью 1-2 ударов по стенке пробирки). Если на стенках пробирок после этого остались капли, стряхнуть их на дно энергичным движением руки, держа закрытую пробирку за крышку, или с помощью микроцентрифуги с охлаждением. Немедленно использовать смесь! Хранить смесь на холоде не более 10 минут! **ВНИМАНИЕ!** Здесь и далее следует использовать дозаторы (пипетки), диапазон объемов которых, заявленный производителем, соответствует объемам, указанным в настоящей инструкции. Необходимо менять наконечники пипетки между разными реагентами и разными образцами!

Подготовить автоматический дозатор, установленный на 8,5 мкл, с надетым наконечником, охладить наконечник, опустив его на 5 - 10 секунд в холодную (стоящую в изотермическом штативе или во льду) смесь «РС» и «Фермента».

Таблица 3 – подготовка смеси «РС» и «Фермента» согласно количеству анализируемых проб*

Компонент	Объем на 1 пробу, мкл	Объем на 10 проб, мкл	Объем на 24 пробы, мкл	Объем на 48 проб, мкл	Объем на 96 проб, мкл
«РС»	24	264	634	1267	2534
«Фермент»	1,5	16,5	40	79	158

*Для исследования любого другого числа проб (20, 30, 40...) количество «РС» и «Фермента» для 10 проб нужно умножить на соответствующий коэффициент (2, 3, 4...).

Разделить смесь «РС» и «Фермента» между охлажденными микропробирками для ПЦР так, чтобы в каждую микропробирку для ПЦР было внесено 8,5 мкл смеси.

Добавить в микропробирки реагенты согласно таблице 4, используя в качестве образца препарат РНК, полученный, как описано в разделе 11, в соответствии с инструкцией по применению комплектов/наборов для выделения РНК, зарегистрированных в установленном порядке на территории Российской Федерации. Каждый из образцов распределяется между 3 тестовыми микропробирками (по 1,5 мкл одного и того же образца в каждую из тройки микропробирок).

Перемешать смесь в каждой пробирке ударом пальца по пробирке. Если на стенках пробирок после этого остались капли, стряхнуть их на дно энергичным движением руки, держа закрытую пробирку за крышку, или с помощью микроцентрифуги с охлаждением.

Таблица 4 – Схема постановки реакции в тестовых и контрольных микропробирках.

Компонент	Каждая проба анализируется в 3 тестовых микропробирках:			Отрицательный контроль	Положительный контроль
Смесь «РС» + «Фермент»	8,5 мкл	8,5 мкл	8,5 мкл	8,5 мкл	8,5 мкл
Образец	1,5 мкл	1,5 мкл	1,5 мкл	-	-
«К-»	-	-	-	1,5 мкл	-
«К+»	-	-	-	-	1,5 мкл
Суммарный объем	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл	10 мкл

Незамедлительно поместить микропробирки в амплификатор. Обозначить в программе положение пробирок с контрольными образцами и анализируемыми образцами согласно инструкции к прибору и запустить программу амплификации.

13. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

13.1. Учет результатов анализа.

Для отрицательного контроля «К-»: значение порогового цикла C_t в канале SYBR (FAM) не должно определяться (на ряде амплификаторов это обозначается как значение порогового цикла C_t 0,00) или должно составлять не менее 57 циклов (в случае циклов по 20 секунд). Если для «К-» значение C_t менее 57 циклов, это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае результаты по данной постановке считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

Для положительного контроля «К+»: значение C_t в канале SYBR (FAM) должно быть менее 57 циклов.

Для каждой микропробирки: значение C_t в канале SYBR (FAM) должно быть более 6 циклов (по 20 секунд). Если в первые 2 минуты реакции (в первые 6 циклов по 20 секунд) выявляется амплификация (иначе говоря, кинетическая кривая флуоресценции пересекает пороговую линию), такая амплификация считается неспецифической и не учитывается при анализе.

Кроме того, НЕ учитываются, т. к. являются неспецифическими, пологие кривые, по форме НЕ напоминающие типичную кривую, получаемую в ПЦР (т. е. кривую с экспоненциальным накоплением продукта амплификации, как на рис. 2). На рис. 1 они находятся под пороговой линией, но даже если они пересекают пороговую линию, то также не учитываются. Учитываются только характерные кинетические кривые роста сигнала флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы, как на рис. 2.

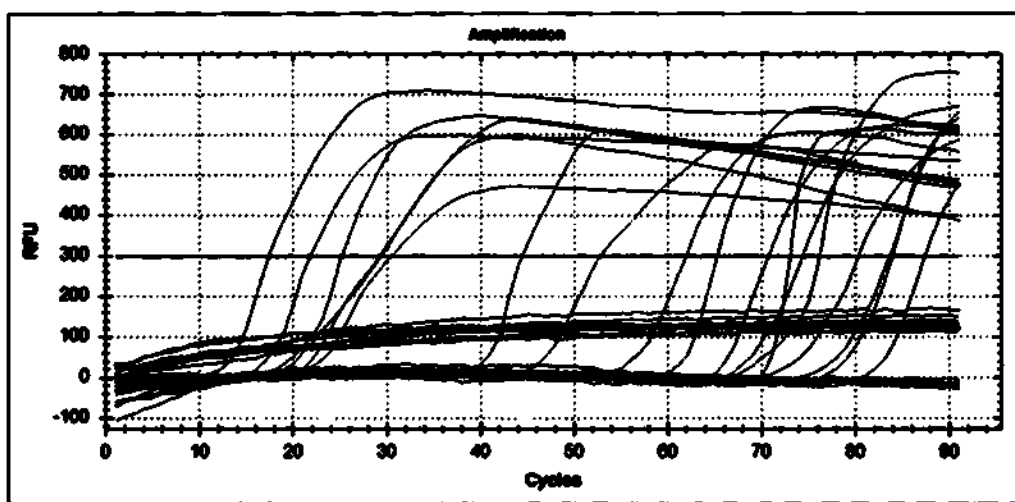


Рис. 1. Кривые, обычно наблюдаемые при анализе.

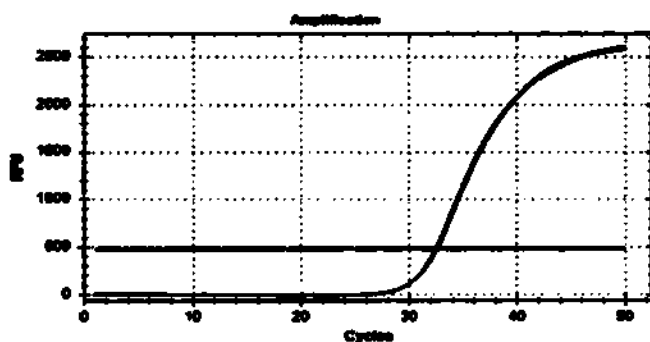


Рис. 2. Пример кривых, которые следует учитывать.

13.2. Интерпретация результатов анализа.

Если ни в одной из тройки микропробирок, в которых анализировался образец, значение C_t в канале SYBR (FAM) не определяется (на ряде амплификаторов это обозначается как значение порогового цикла C_t 0,00) или составляет не менее 57 циклов, анализируемый образец считать отрицательным, то есть не содержащим РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Если хотя бы в одной из тройки микропробирок, в которых анализировался образец (при этом не учитываются микропробирки, где C_t в канале SYBR (FAM) меньше или равно 6 циклам или нет характерной формы кривой, см. раздел 13.1), значение C_t в канале SYBR (FAM) составляет менее 57 циклов, анализируемый образец считать положительным, то есть содержащим РНК коронавируса SARS-CoV-2.

14. КОНТАМИНАЦИЯ

РНК коронавируса SARS-CoV-2 не должна выявляться в отрицательном контроле «К-». Обнаружение последовательности нуклеотидов, характерной для коронавируса SARS-CoV-2, в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время подготовки к проведению исследования.

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 21.20.23-004-16139243-2020.

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 RNA REAL». Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Наборов реагентов «SBT-DX-SARS-CoV-2 RNA REAL».

17.3. Набор реагентов не выявляет наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2, если его концентрация в анализируемом образце ниже заявленного (см. раздел 6.1) предела обнаружения.

17.4. Для определения наличия или отсутствия РНК коронавируса SARS-CoV-2, рекомендуется использовать назофарингеальные и/или орофарингеальные мазки, так как РНК коронавируса SARS-CoV-2 может не выявляться в других клинических образцах.

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 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 хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 25°C до минус 15°C в течение всего срока годности. Вскрытые Наборы и пробирки с реагентами хранят при тех же условиях.

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

20. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности Набора реагентов составляет 12 месяцев* с даты выпуска предприятием-изготовителем.

*Примечание: данные не подтверждены исследованиями в реальном времени. Исследование стабильности Набора реагентов в реальном времени продолжается. Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

21. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ И СВЕДЕНИЯ О РЕКЛАМАЦИЯХ

ООО «Система-БиоТех» гарантирует стабильность Наборов реагентов, 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, а также в случае изменения аналитических характеристик следует обращаться к производителю: ООО «Система-БиоТех», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, строение 11, эт/пом/ком 5/1/13, 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



Медицинское
изделие для диагностики
in vitro



Изготовитель



Дата изготовления



Температурный
диапазон



Запрет на
повторное применение



Осторожно!
Обратитесь к инструкции по
применению



Содержимого
достаточно для проведения п-
количества тестов



Использовать до



Обратитесь к
инструкции по применению



Не допускать
воздействия солнечного света

В настоящем документе прошито,
пронумеровано и скреплено
печатью



(восемь) лист 06

Представитель, действующий по
доверенности № 10/20 от 03.07.2020
«Система-БиоТех»
Позднякова Наталья Вячеславовна