

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «НПФ Синтол»

А.Кузубов

«25» февраля 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению «Набора реагентов для выявления РНК коронавируса
SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном
времени (ОТ-ПЦР-РВ- SARS-CoV-2)»
по ТУ 21.20.23-003-97313483-2021, серия 050321**

2021

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus</i> новый коронавирус, выявленный во второй половине 2019, вызвавший пандемию пневмонии нового типа
COVID-19	CO rona VI rus D isease 2019 тяжелая острая респираторная инфекция, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2
ОТ-ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в реальном времени, совмещенная с обратной транскрипцией
МАНК	- методы амплификации нуклеиновых кислот
НК	- нуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОКО-В	- отрицательный контрольный образец выделения
ПКО-В	- положительный контрольный образец выделения (ПКО, проведенный через выделение)
ВПК-В-РНК	- внутренний положительный контроль выделения РНК
ВПК-ОТ	- внутренний положительный контроль обратной транскрипции
ОРИ	- острая респираторная инфекция

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

«Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2)» по ТУ 21.20.23-003-97313483-2021, серия 050321.

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» предназначен для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) и флуоресцентной детекцией в препаратах НК, выделенных из проб, полученных при взятии мазков со слизистой носо- и

ротоглотки, мокроты, промывных вод бронхов, полученных при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж).

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования для этиологической диагностики тяжелой острой респираторной инфекции - COVID-19 с помощью МАНК при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание).

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика COVID-19. Набор может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения.

1.4 Показания, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению

1.4.1 Показания к проведению исследования

В обязательном порядке лабораторное обследование на COVID-19 с применением МАНК проводится следующим категориям лиц:

- Прибывшие на территорию Российской Федерации с наличием симптомов инфекционного заболевания (или при появлении симптомов в течение периода медицинского наблюдения);
- Контактировавшие с больным COVID-19, при появлении симптомов, не исключающих COVID-19, в ходе медицинского наблюдения и при отсутствии клинических проявлений на 8-10 календарный день медицинского наблюдения со дня контакта с больным COVID-19;
- Пациенты с диагнозом "внебольничная пневмония";
- Работники медицинских организаций, имеющих риск инфицирования при профессиональной деятельности,
 - до появления IgG – 1 раз в неделю;
 - при появлении симптомов, не исключающих COVID-19, – немедленно;

- Лица, находящиеся в интернатах, детских домах, детских лагерях, пансионатах для пожилых и других стационарных организациях социального обслуживания, учреждениях уголовно-исполнительной системы при появлении респираторных симптомов;
- Лица старше 65 лет, обратившиеся за медицинской помощью с респираторными симптомами;
- Работники стационарных организаций социального обслуживания населения, учреждений , уголовно-исполнительной системы и работники при вахтовом методе работы до начала работы в организации с целью предупреждения заноса COVID-19;
- Дети из организованных коллективов при возникновении 3-х и более случаев заболеваний, не исключających COVID-19 (обследуются как при вспышечной заболеваемости).

При обращении в медицинские организации лабораторному обследованию на РНК SARS-CoV-2 подлежат пациенты без признаков ОРВИ при наличии следующих данных эпидемиологического анамнеза:

- Возвращение из зарубежной поездки за 14 дней до обращения;
- Наличие тесных контактов за последние 14 дней с лицами, находящимися под наблюдением по инфекции, вызванной SARS-CoV-2, которые в последующем заболели;
- Наличие тесных контактов за последние 14 дней с лицами, у которых лабораторно подтвержден диагноз COVID-19;
- Наличие профессиональных контактов с биоматериалом от пациентов с COVID-19 и лиц с подозрением на данное заболевание (врачи, специалисты с высшим профессиональным (не медицинским) образованием, средний и младший медицинский персонал);
- Рождение от матери, у которой за 14 дней до родов был выявлен подозрительный или подтвержденный случай COVID-19.

(см. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» утв. Минздравом России, Роспотребнадзором).

1.4.2 Противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты

В ходе менеджмента риска установлено, что применение изделия для диагностики ин витро «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» не создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не используют внутри или на теле человека, следовательно, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению, отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях:

- нарушенной внутренней упаковки или не соответствующего описанию внешнего вида реагентов;
- несоблюдения условий транспортирования и хранения согласно инструкции;
- истекшего срока годности.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Формы выпуска

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов для выделения РНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System «М-Сорб-НК», комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-PB анализа «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2».

Форма 2 включает комплект реагентов для выделения РНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System «М-Сорб-НК», комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ анализа «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л».

Форма 3 включает комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ анализа «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2».

Форма 4 включает комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ анализа «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л».

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на магнитных частицах и амплификацию РНК методом обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения амплификации РНК методом обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для проведения полного ПЦР-исследования с использованием форм комплектаций 3 и 4 необходимо использовать комплект реагентов для экстракции РНК «РИБО-преп», ФСР 2008/03147.

2.2 Состав набора

2.2.1 Комплект реагентов для выделения РНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System «М-Сорб-НК»

Комплект предназначен для выделения РНК ручным способом или на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах.

Комплект рассчитан на 96 анализируемых проб (96 выделений), включая контрольные образцы.

Комплект реагентов состоит из 5 реагентов.

№	Реагент	Объем	Кол-во
1.	Лизирующий раствор, ЛОР	50 мл	1 флакон
2.	Сорбирующий раствор, СР	4 мл	1 флакон
3.	Промывочный раствор, ПР-А4	65 мл	1 флакон
4.	Элюирующий раствор, ЭР	18 мл	1 флакон
5.	Отрицательный контрольный образец выделения, ОКО-В	1 мл	1 пробирка

2.2.2 Комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ

2.2.2.1 Вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2»

Комплект реагентов состоит из 7 реагентов.

Комплект в варианте исполнения жидкой реакционной смеси рассчитан на 96 анализируемых проб (96 реакций), включая контрольные образцы.

№	Состав комплекта	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, PC-SARS-CoV-2	1,5 мл	1 пробирка
2.	Внутренний положительный контроль обратной транскрипции, ВПК-ОТ	0,02 мл	1 пробирка
3.	Смесь ферментов, E-Mix	—	1 пробирка
4.	Разбавитель фермента, РФ	0,11 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО-nCov	—	1 пробирка
6.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	1 мл	1 пробирка
7.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	1 мл	1 пробирка

2.2.2.2 Вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ- SARS-CoV-2-Л»

Комплект реагентов состоит из 5 реагентов.

Комплект в варианте исполнения лиофилизированной реакционной смеси рассчитан на 96 анализируемых проб (96 реакций), включая контрольные образцы.

№	Состав комплекта	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, PC- SARS-CoV-2-Л	—	12 стрипов по 8 микропробирок
2.	Разбавитель, РБ	1,6 мл	1 пробирка
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-nCov	—	1 пробирка

4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	1 мл	1 пробирка
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	1 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.

2.3 Метод исследования

2.3.1 Принцип метода выделения РНК

Метод выделения РНК с помощью набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» является многошаговым и сочетает освобождение РНК из вирусной частицы, сорбцию РНК на магнитных частицах и осаждение РНК в присутствии осаждающего реагента. Комбинирование сорбентного и осаждающего методов выделения РНК обеспечивает высокую эффективность выделения РНК.

Проба образца обрабатывается лизирующим раствором, содержащим хаотропный агент (гуанидин тиоцианат), обеспечивая разрушение вирусной частицы и освобождение РНК. Растворенная РНК связывается с силиканизированными магнитными частицами в присутствии осаждающего реагента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции РНК к магнитному сорбенту происходит переход РНК с поверхности носителя в раствор, который затем освобождается от частиц сорбента магнитной силой.

В результате указанной процедуры получается препарат РНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Для определения наличия ингибиторов ПЦР и оценки эффективности выделения РНК в состав набора входит внутренний положительный контроль выделения.

2.3.2 Принцип метода выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот коронавируса SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена *N* генома коронавируса SARS-CoV-2, 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 четыре олигонуклеотидных зонда, меченных флуоресцентными красителями FAM, ROX 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)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (Bio-Rad, США), RotorGene (Qiagen, Германия), DTprime (ДНК-

Технология, Россия), QuantStudio5 (ThermoFisher, США) 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 двух фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2, 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; **ROX** – коронавирус SARS-CoV-2 (гены *orf1ab* и *N*); **Cy5** – внутренний положительный контроль ОТ-ПЦР-РВ.

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.

2.3.3 Информация о прослеживаемости значений, заданных для ПКО-nCov

Нуклеотидная последовательность ПКО-nCov полностью гомологична (фрагменты генов *orf1ab* 12651-12814 и *N* 28461-28612 генома коронавируса SARS-CoV-2 по референсной последовательности NC_045512.2) геному коронавируса SARS-CoV-2, одну копию которого содержит каждый вирион коронавируса SARS-CoV-2.

2.4 Ограничения метода

В ходе клинических испытаний (ФГБНУ «ЦНИИТ») при проведении исследований по интерференции с использованием эндогенных (гемоглобин 200 мкг/мл, муцин 5%) и экзогенных потенциально интерферирующих веществ (Хлоргексидин 0,5%, Стоматофит 1,5%, раствор Люголя с глицерином 0,1%, Мирамистин 0,001%) и комплекта реагентов «М-Сорб-НК» ингибирующего влияния интерферентов на функциональные характеристики набора в формах выпуска 1 и 2 не выявлено.

Для выделения РНК при использовании набора в формах выпуска 3 и 4 используют наборы реагентов с известными характеристиками в отношении

интерферентов, зарегистрированные в установленном порядке («РИБО-преп», ФСР 2008/03147).

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения РНК либо проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ОТ-ПЦР-РВ (п. 7.3 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 SARS-CoV-2 и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решений о лечении пациентов.

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

Тест не определяет наличие коронавируса SARS-CoV-2, если его концентрация ниже заявленной аналитической чувствительности ($1,0 \times 10^3$ копий·мл⁻¹). Для достижения необходимой чувствительности аликвота исходного материала (пробы) объемом должна быть не менее 100 мкл.

При возникновении сомнений относительно правильности положительного результата анализа, проверку соответствия функциональных характеристик набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» проводят методом секвенирования. С этой целью осуществляют амплификацию препарата НК, полученного из пробы с сомнительным результатом, с помощью олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении фрагментов гена *orflab* 12651-12814 и гена *N* 28461-28612 генома коронавируса SARS-CoV-2 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 – ООО «НПФ Синтол» Российская Федерация, г. Москва, 125499, Кронштадтский бульвар, д. 39, к. 1, (499) 977-74-55, Email: syntol@syntol.ru. Полученный ПЦР-продукт секвенируют методом Сенгера.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В ходе проведения клинико-лабораторных испытаний на лабораторной базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Сергиев Посад-6 Московской области) были подтверждены заявленные функциональные характеристики медицинского изделия. Аналитическую специфичность набора реагентов определяли на препаратах, содержащих НК возбудителей респираторных инфекций: коронавируса SARS-CoV-2 штамм «2019-nCoV изолят В»; вируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) штамм СоД, вируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) штамм EMC/2012, вирусов гриппа типа А (H1N1, H3N2, H7N9, H5N1) и В, респираторно-синцитиального вируса (PCV) штамм «hRSV-1», аденовируса 5 типа человека, риновируса человека штамм «Рино/1а/Ленинград/78», метапневмовируса человека штамм «НМ-1», коронавируса человека штамм «Lp/Ленинград/2/77», вируса парагриппа 1 типа штамм «Сендай», *Human respirovirus* 1 штамм С-39, *Streptococcus pneumoniae* штамм ATCC49619, *Haemophilus influenzae type B* штамм ATCC49247. Аналитическую чувствительность определяли с помощью серийных разведений инаktivированного «2019-nCoV изолят В» вируса SARS-CoV-2 на биологическом материале (назофарингеальные и орофарингеальные мазки в 1 мл транспортной среды), полученном от людей без признаков ОРВИ и предварительно протестированных на отсутствие возбудителей респираторных инфекций человека.

3.1.1 Чувствительность

Чувствительность – $1,0 \times 10^3$ копий РНК в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹) с воспроизводимостью не менее 95 %.

3.1.2 Специфичность

Специфичность – ложноположительные результаты при анализе образцов НК респираторных инфекций: вирусы тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), гриппа типа А (H1N1, H3N2, H7N9, H5N1) и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), аденовирус 5 типа человека, риновирус человека, метапневмовирус человека, коронавирус человека, вирус парагриппа 1 типа, респираторный вирус человека, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae type B*, отсутствовали.

3.1.3 Воспроизводимость

В ходе валидации набора реагентов в различных сочетаниях форм комплектации, автоматического и ручного выделения НК, пяти видов амплификаторов, мест и времени анализа, а также различными операторами, установлены следующие значения воспроизводимости:

- форма 1, ручное и автоматическое выделение НК, пять амплификаторов, различные операторы, места и время анализа – 95 %;
- форма 2, ручное и автоматическое выделение НК, пять амплификаторов, различные операторы, места и время анализа – 95 %;
- форма 3, выделение НК набором «РИБО-преп», пять амплификаторов, различные операторы, места и время анализа – 95 %;
- форма 4, выделение НК набором «РИБО-преп», пять амплификаторов, различные операторы, места и время анализа – 95 %.

3.2 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические испытания МИ проведены в ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2).

В ходе клинических испытаний на образцах, содержащих и не содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2, доказана эффективность МИ «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2)» для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на магнитных частицах и амплификацию РНК методом обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени, а также для проведения амплификации РНК методом обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (в зависимости от формы выпуска):

- при анализе 96 заведомо положительных образцов диагностического материала был получен положительный результат ОТ-ПЦР в 100% случаев (чувствительность теста - не менее 96,23% с доверительной вероятностью 95%);

- при анализе 120 заведомо отрицательных образцов диагностического материала, был получен отрицательный результат ОТ-ПЦР в 100% случаев (специфичность теста - не менее 96,97% с доверительной вероятностью 95%).

Ингибирующего влияния эндогенных (гемоглобин 200 мкг/мл, муцин 5%) и экзогенных (Хлоргексидин 0,5%, Стоматофит 1,5%, Мирамистин 0,001%, раствор Люголя с глицерином 0,5%) потенциально интерферирующих веществ на результат ОТ-ПЦР при исследовании образцов набором «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» не обнаружено.

Внутрипостановочная повторяемость результатов исследования на выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 набором реагентов «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» во всех формах выпуска на всех использованных в испытаниях приборах составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторностей каждого образца не более 3,24%.

Доказана полная согласованность результатов, полученных с использованием представленного для испытаний набора «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» и референтных наборов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

Безопасность набора реагентов, включающее допустимость рисков, с учетом общепризнанного уровня техники для определения пригодности медицинского изделия в целях размещения его на рынке в соответствии с предусмотренным применением/предусмотренным назначением, регламентирована ГОСТ ISO 14971-2011.

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 SARS-CoV-2 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 (COVID-19)» и «Временных рекомендаций по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV».

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». 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.

Компонент «Лизирующий раствор, ЛОР» классифицируется как опасный. Коды заявленной опасности: химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи – H302, H332, H315; химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз – H319; химическая продукция, вызывающая коррозию металла H290.

Компоненты набора «Реакционная смесь PC-SARS-CoV-2», «Раствор для разбавления фермента, РФ», «Разбавитель, РБ» содержат азид натрия.

При работе с набором следует 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

В состав компонентов набора PC-SARS-CoV-2, PC-SARS-CoV-2-Л и E-Mix входят следующие материалы животного происхождения – БСА, рекомбинантная Taq-полимераза и рекомбинантная MmLV-ревертаза, являющиеся биологически безопасными.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку входящие в состав изделия вещества (Taq-полимераза, MmLV-ревертаза и БСА) являются биологически безопасными.

Применение изделия для диагностики ин витро «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2» не создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не используют внутри или на теле человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-PB – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) – «АНК-32 (32М)» (ИАП РАН,

г. Санкт-Петербург; ФСР 2010/08892), CFX-96 (Bio-Rad, США; ФСЗ 2008/03399), RotorGene (Qiagen, Германия; ФСЗ 2010/07595), DTprime (ДНК-Технология, Россия; ФСР 2011/10229), QuantStudio5 (Thermofisher, США; РЗН 2019/8446).

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором (комплект для выделения РНК) следует проводить в шкафу биологической безопасности (ШББ) не ниже 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия, ФСР 2012/13259), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

Комплект реагентов для выделения РНК может быть использован в автоматизированных станциях KingFisher Flex System (Thermofisher, США, ФСЗ 2009/05562) или их аналогах. Автоматизированные станции для выделения РНК должны быть установлены в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

Работу с набором (комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ) следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия, ФСР 2010/07114), 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, 20-200 мкл и на 100-1000 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

5.4.1 Для выделения РНК ручным методом

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100 °С (например, «Циклотемп-303», ФСР 2009/05970);

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5425, ФСЗ 2009/04411);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901», РЗН 2014/1454);

отсасыватель медицинский (например, ОМ-1, ФСР 2010/08928);

штативы для наконечников и микропробирок объемом 1,5 и 2 мл;

магнитный штатив (например, кат. номер СТ-16, ООО Синтол);

холодильник на 2-8 °С.

5.4.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях

Холодильник на 2-8 °С.

5.4.3 Для постановки ОТ-ПЦР-РВ

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901», РЗН 2014/1454);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903», ФСР 2009/05969);

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

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

холодильник/морозильник на 2-8 °С/минус 16-20 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

5.6.1 Для выделения РНК ручным методом

Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФСР 2008/03147) – для форм комплектации 3 и 4;

микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
комплект средств для обработки рабочего места.

5.6.2 Для выделения РНК на автоматизированных станциях

Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ФСР 2008/03147) – для форм комплектации 3 и 4;

одноразовые насадки на магнитные стержни для магнитной сепарации для системы KingFisher Flex;

одноразовые планшеты 96-луночные глубокие для системы KingFisher Flex;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места и автоматизированной станции.

5.6.3 Для постановки ОТ-ПЦР-РВ

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;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

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 мазков со слизистой носо- и ротоглотки, мокроты, промывных вод бронхов, полученных при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж). Основным видом биоматериала для лабораторного исследования на РНК SARS-CoV-2 является материал, полученный при заборе мазка из носоглотки (из двух носовых ходов) и ротоглотки. Мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки собираются в одну пробирку для большей концентрации вируса.

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 (COVID-19)» и «Временных рекомендаций по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV».

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ).

Мазок из носоглотки или ротоглотки (зева) берется стерильным тампоном, который после взятия материала помещается в стерильную пластиковую пробирку с транспортной средой (с учетом рекомендаций производителя применяемых наборов реагентов). Для повышения концентрации вируса носоглоточные и орофарингеальные мазки должны быть помещены в одну пробирку.

Мокрота собирается в одноразовый стерильный пластиковый контейнер объемом 30-50 мл, герметично закрывающийся заворачивающейся пробкой. Диаметр горлышка контейнера должен быть не менее 30 мм. Необходимо убедиться, что собранный материал представляет собой мокроту (отделяемое нижних дыхательных путей).

Бронхоальвеолярный лаваж собирается в стерильный одноразовый контейнер.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Биологический референтный интервал применения медицинского изделия составляет от $1,0 \cdot 10^{11}$ до $1,0 \cdot 10^3$ копий РНК участков генов *orflab* и *N* генома SARS-CoV-2 в миллилитре пробы.

Выделение РНК проводят с помощью комплекта для экстракции РНК ручным методом или в автоматизированных станциях KingFisher Flex (ФСЗ 2009/05562). Для достижения необходимой чувствительности аликвота исходного материала (пробы) объемом должна быть не менее 100 мкл.

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 внутренний положительный контроль выделения (**ВПК-В-РНК**). Регистрация роста сигнала по каналу **FAM** свидетельствует об успешном выделении РНК.

Для контроля обратной транскрипции РНК используют внутренний положительный контроль обратной транскрипции (**ВПК-ОТ**). Регистрация роста сигнала по каналу **Sy5** свидетельствует об успешном проведении обратной транскрипции 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 (COVID-19)» и «Временных рекомендаций по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV» (таблица 1).

Таблица 1 – 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 °С	<= 5 дней: 4 °С > 5 дней <*>: -70 °С	Носоглоточные и орофарингеальные тампоны должны быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер	4 °С	<= 48 часов: 4 °С > 48 часов <*>: -70 °С	Возможно (небольшое разведение образца
Мокрота	Стерильный контейнер <*>	4 °С	<= 48 часов: 4 °С > 48 часов <*>: -70 °С	Убедитесь, что материал поступает из нижних дыхательных путей

*при невозможности обеспечить хранение при минус 70 С. Образцы хранить при минус 20 С;

**для транспортировки образцов используют ТС (транспортную среду), содержащую противогрибковые и антибиотиковые добавки.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

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 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение РНК комплектом «М-Сорб-НК»

Процедуру выделения РНК с помощью комплекта «М-Сорб-НК» проводят ручным методом или на автоматизированных станциях в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

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

Для определения наличия ингибиторов ОТ-ПЦР-РВ и оценки эффективности выделения РНК в состав набора (комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ) входит внутренний положительный контроль выделения (**ВПК-В-РНК**).

Для контроля выделения коронавируса SARS-CoV-2 на этапе выделения РНК возможно использование положительного контрольного образца (**ПКО-В**) (используют ПКО, входящий в состав комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ).

7.1.1 Проведение выделения РНК ручным методом

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (**ОКО-В**) (1 на 10-24 исследуемых образцов при ручном выделении или 1 на 24-48 при автоматическом выделении), который потом обязательно анализируется в

ОТ-ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения РНК.

ВНИМАНИЕ! При возникновении «аварии» на каком-либо этапе во время выделения РНК (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца попали на рабочую поверхность и т.д.), необходимо сменить перчатки и провести деконтаминационные работы!

ВНИМАНИЕ! При хранении в холодильнике от плюс 2 до плюс 8 °С возможна кристаллизация ВПК-В-РНК. В случае необходимости, пробирку с ВПК-В-РНК следует прогреть при температуре не выше плюс 65 °С до полного исчезновения кристаллов. Все остальные реактивы необходимо предварительно довести до комнатной температуры и перемешать плавным переворачиванием.

I. Лизис

- Маркируют необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с планом исследования. Пробирки с ОКО-В расставляют в соответствии с маркировкой между образцами (1 на 10-24 исследуемых образцов).
- Вносят в пробирки по 500 мкл лизирующего раствора **ЛОР** и по 10 мкл **ВПК-В-РНК**;
- Флакон с сорбирующим раствором **СР** тщательно перемешивают и вносят в пробирки по 40 мкл **СР**;

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором **ЛОР** добавить весь объем внутреннего положительного контроля выделения ВПК-В-РНК и сорбирующего раствора **СР**. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в подготовленные пробирки по 550 мкл рабочего раствора.

- В каждую пробирку ОКО-В вносят по 100 мкл **ОКО-В** из комплекта;
- Вносят по 100 мкл **исследуемой пробы** в подготовленные пробирки, за исключением пробирок с ОКО-В. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугируют для сброса капель и помещают в термостат;

- Образцы выдерживают в термостате при температуре 65 °С в течение 7 минут, периодически перемешивая;
- Вынимают пробирки из термостата, охлаждают при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Пробирки со смешанными реагентами ЛОР, СР и ВПК-В-РНК можно приготовить заранее и хранить при 2-8°С в защищенном от света месте в течение 7 дней. Использовать готовые пробирки по необходимости, предварительно доведя до комнатной температуры с последующим центрифугированием на микроцентрифуге-встряхивателе при максимальных оборотах в течение 10 секунд.

II. Сорбция и осаждение РНК

- Тщательно перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента и выдерживают 7 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая;
- Устанавливают пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугируют в течение 3 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;
- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;

ВНИМАНИЕ! Надосадочную жидкость необходимо отбирать ПОЛНОСТЬЮ во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!

- Вынимают пробирки из магнитов и переставляют в обычные лунки.

III. Промывка РНК

- Добавляют в пробирки 600 мкл промывочного раствора ПР-А4, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;

- Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;
- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;

ВНИМАНИЕ! Надосадочную жидкость необходимо отбирать **ПОЛНОСТЬЮ** во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!

IV. Десорбция РНК

- Готовят чистые 1,5 мл пробирки для следующего этапа (десорбции РНК). Маркируют.
- Добавляют в пробирки с сорбентом 120 мкл элюирующего раствора ЭР, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- Центрифугируют пробирки кратковременно для сброса капель и устанавливают в термостат;
- Выдерживают пробирки в термостате в течение 7 мин. при температуре 65°C, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе;
- Центрифугируют пробирки в течение 1 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹ и устанавливают в магнитный штатив на 1-2 мин.;
- Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, переносят 100 мкл раствора РНК в чистые пробирки в соответствии с маркировкой.

ВНИМАНИЕ! Если некоторое количество магнитного сорбента было перенесено вместе с раствором РНК, перед постановкой ОТ-ПЦР-РВ необходимо установить пробирки с образцами в магнитный штатив и производить забор образца, не вынимая пробирки из магнитного штатива.

7.1.2 Выделение РНК на автоматизированных станциях KingFisher Flex System

Для выделения РНК комплектом «М-Сорб-НК» с помощью роботизированной станции KingFisher Flex System:

- Включают управляющий компьютер и саму станцию.
- В чистой ёмкости смешивают лизирующий раствор **ЛОР**, внутренний положительный контроль выделения **ВПК-В-РНК** и сорбирующий раствор **СР**. Тщательно перемешивают;
- Вносят в лунки рабочего планшета 1 по 550 мкл готовой смеси **ЛОР+ВПК-В-РНК+СР**;

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором ЛОР добавить весь объем внутреннего положительного контроля выделения ВПК-В-РНК и сорбирующего раствора СР. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в лунки рабочего планшета по 550 мкл рабочего раствора.

- Вносят в лунки планшета 2 по 600 мкл промывочного раствора (**ПР-А4**);
- Вносят в лунки планшета 3 по 150 мкл элюирующего раствора (**ЭР**);
- Вносят в лунки подготовленного планшета 1 по 100 мкл образцов (включая **ОКО**, **ПКО**)¹;
- Запускают протокол и далее следуют инструкциям протокола.

7.1.3 Условия хранения анализируемых проб (образцов РНК)

Раствор РНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в течение 12 часов и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

¹ В каждую партию выделения наряду с исследуемыми образцами необходимо включать **ОКО-В** (1 на 24-48 образцов), который потом обязательно анализируется в ОТ-ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Дополнительно в постановку можно включать положительный контрольный образец, **ПКО-В** (ПКО входит в состав комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ). При выделении полного рабочего планшета (96 образцов) в постановку рекомендуется включить 3 **ОКО-В** (позиции B2, E6, G12) и 1 **ПКО-В** (позиция H12).

7.2 Проведение ОТ-ПЦР-РВ

ОТ-ПЦР-РВ проводят в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

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

7.2.1 Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ

7.2.1.1 Вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2»

Расход реагентов на одно определение и каждый анализ показан в таблице 2.

Таблица 2 – Расход реагентов комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ, вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2»

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 определение	на каждый анализ
Реакционная смесь, PC-SARS-CoV-2	15 мкл	15 x (N ² +2) мкл, где N – количество исследуемых образцов; 2 – контроли ³ (ПКО, ОКО)
ВПК-ОТ	0,2 мкл	0,2 x (N+2)
E-Mix	1 мкл	1 x (N+2)
ПКО-nCoV	-	20 мкл
ОКО	-	20 мкл

— Размораживают пробирки с реакционной смесью PC-SARS-CoV-2, разбавителем фермента РФ⁴, раствором для разбавления ПКО⁴ ОКО, выдерживают 15 минут при комнатной температуре, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют в течение нескольких секунд для сброса капель.

— В пробирку с сухим содержимым ПКО-nCoV добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения,

² Отрицательные контроли выделения (ОКО-В) анализируют как исследуемые образцы.

³ Если ПКО использовали при выделении (ПКО-В), то в постановку можно не включать ПКО.

⁴ Если E-Mix и ПКО были приготовлены ранее, то размораживают пробирки с E-Mix и ПКО.

центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных (препаратов **ПКО-пCoV** допускается при температуре) 20 °С в течение срока годности набора реагентов;

- В пробирку с сухим содержимым **E-Mix** добавляют **110 мкл РФ**, перемешивают пипетированием до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенного препарата **E-Mix** допускается при температуре не выше минус 20 °С в течение срока годности набора реагентов;
- Отбирают необходимое число микропробирок объемом 0,2 мл для проведения ОТ-ПЦР-РВ, устанавливают в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования;
- В отдельной чистой пробирке подходящего размера смешивают:
15 x (N+2) мкл реакционной смеси **PC-SARS-CoV-2**
0,2 x (N+2) мкл ВПК-ОТ
1 x (N+2) мкл смеси ферментов **E-Mix**,
где **N** – количество исследуемых образцов, включая **ОКО-В**, **2** – количество контролей (**ПКО**, **ОКО**)
- Полученную смесь перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют в течение нескольких секунд. Вносят полученную рабочую реакционную смесь по **15 мкл** в 0,2 мл пробирки, установленные в штатив;
- Вносят в подготовленные 0,2 мл пробирки по **20 мкл ОКО**, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, **ПКО-пCoV**, используя наконечники с аэрозольным барьером, плотно закрывают крышки.
- Перемешивают содержимое микропробирок на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют 30 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

ВНИМАНИЕ! После смешивания реакционной смеси и препарата **РНК**, микропробирки сразу установить в амплификатор и запустить **ОТ-ПЦР-РВ**.

7.2.1.2 Вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л»

Расход реагентов на одно определение и каждый анализ рассчитывают согласно таблице 3.

Таблица 3 – Расход реагентов комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ, вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л»

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 определение	на каждый анализ
Стрипованные микропробирки, РС- SARS-CoV-2-Л	1 пробирка	$N+2$, где N^5 – количество исследуемых образцов; 2 – контроли ⁶ (ПКО, ОКО)
РБ	15 мкл	$15 \times (N+2)$ мкл
ПКО-nCoV	-	20 мкл
ОКО	-	20 мкл

- Комплект реагентов извлекают из холодильника, **РБ** и **ОКО** перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;
- В пробирку с сухим содержимым **ПКО-nCoV**⁷ добавляют **200 мкл ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов ПКО-nCoV допускается при температуре не выше минус 20 °С в течение срока годности набора реагентов;
- Отбирают необходимое число микропробирок с **РС-SARS-CoV-2-Л**, устанавливают в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования;
- Открывают крышки микропробирок и вносят в них по **15 мкл РБ**;
- Вносят в пробирки по **20 мкл ОКО**, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, **ПКО-nCoV**, используя наконечники с

⁵ Отрицательные контроли выделения (**ОКО-В**) анализируют как исследуемые образцы.

⁶ Если ПКО использовали при выделении (**ПКО-В**), то в постановку можно не включать ПКО.

⁷ Если ПКО был приготовлен ранее, то размораживают пробирку с ПКО.

аэрозольным барьером, плотно закрывают крышки данных микропробирок;

- Перемешивают содержимое микропробирок на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют 30 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

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

7.2.2 Проведение ОТ-ПЦР-РВ

- Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования и прикрывают крышки микропробирок;
- Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;
- Вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 4 и вводят красители **FAM** (Green), **ROX** (Orange) и **Sy5** (Red). Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Green – 4, Orange – 5, Red – 7;

Таблица 4 – Температурно-временной режим амплификации

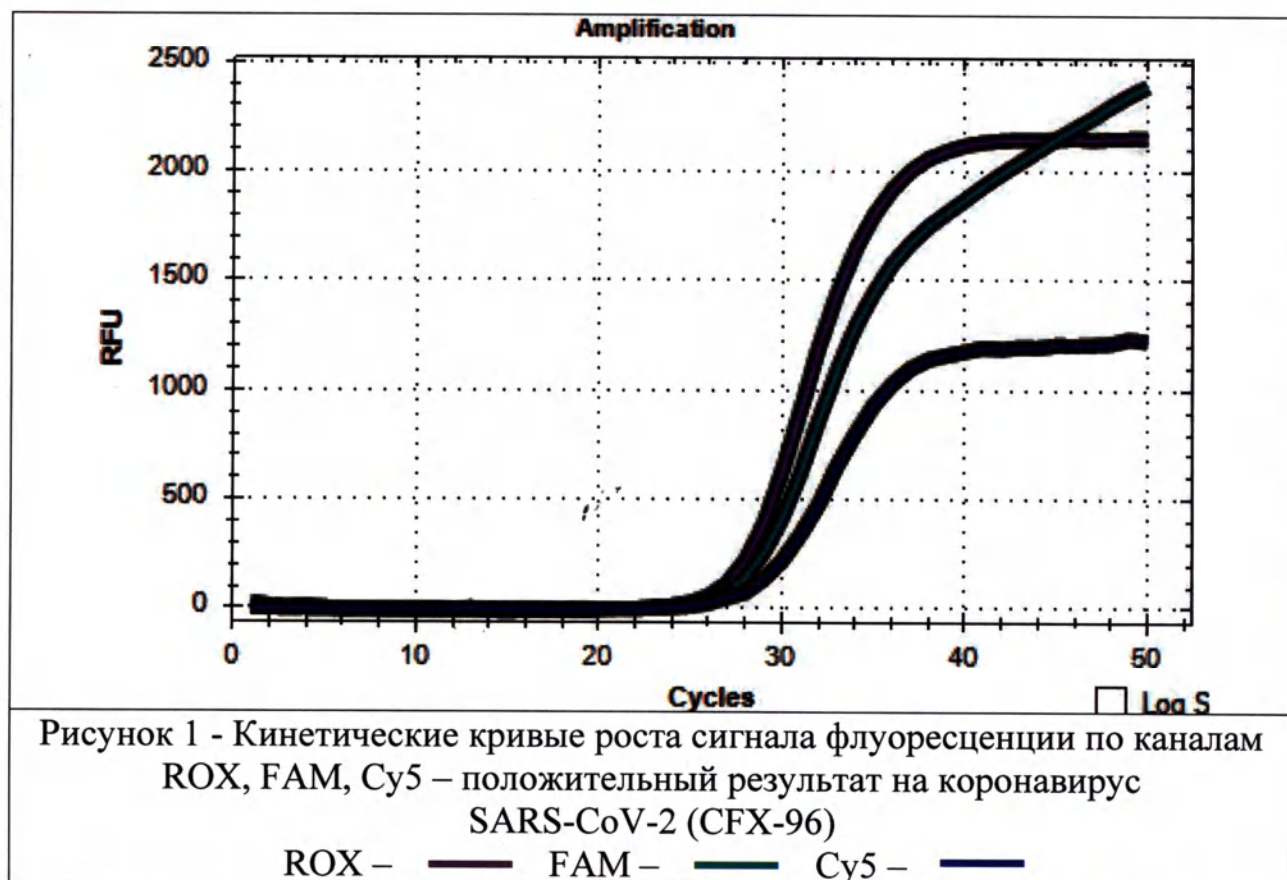
№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	50 °С – 900 секунд	1
2	95 °С – 300 секунд	1
3	95 °С – 10 секунд	50
4	58 °С – 10 секунд Считывание сигнала флуоресценции	
5	72 °С – 20 секунд	

- Вводят сведения об образцах по всем красителям и активируют прибор в соответствии с руководством по эксплуатации;
- 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.

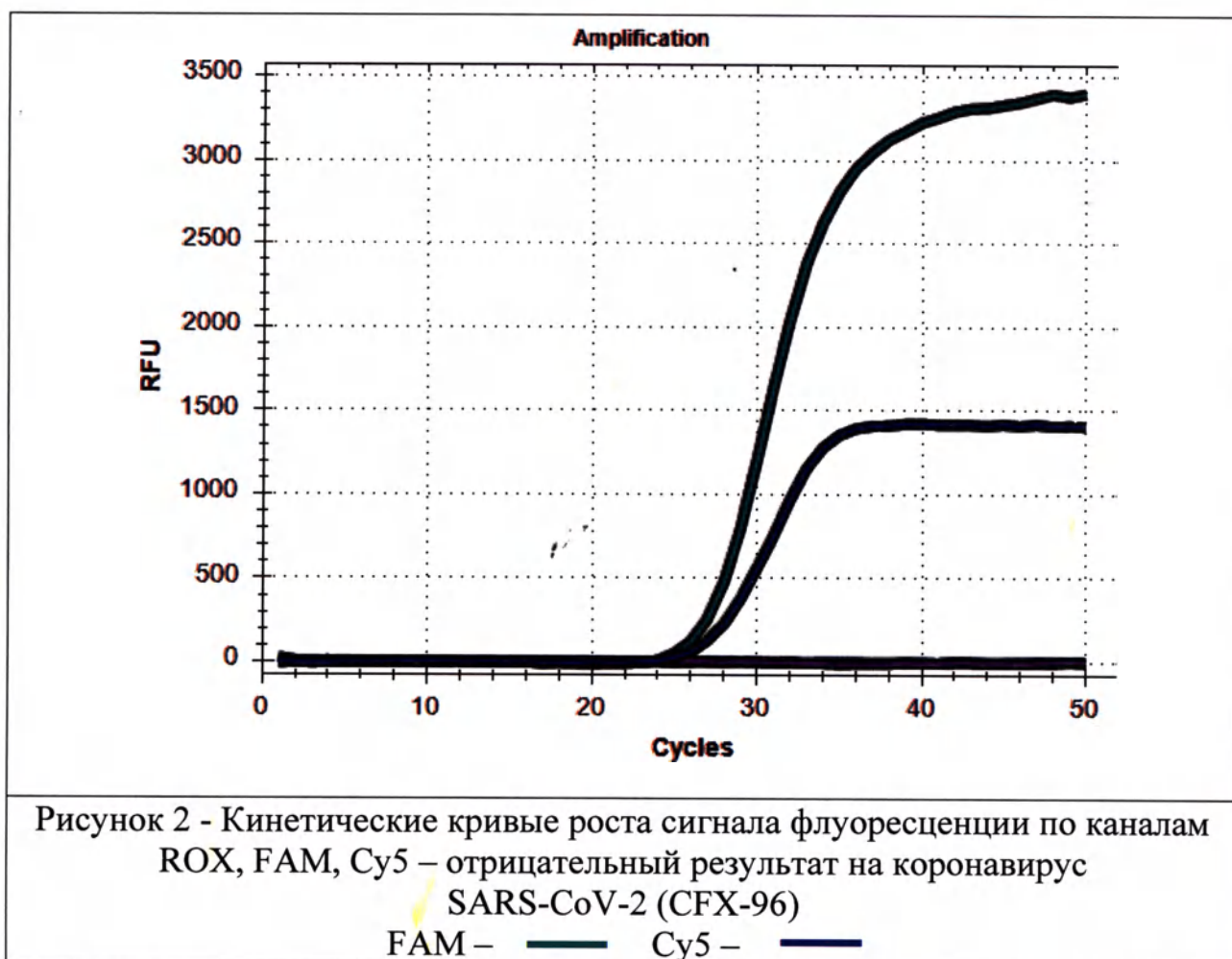
7.2.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

Оценку результатов проводят с помощью приборов для ПЦР-РВ, например, «АНК-32 (32М)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, ФСР 2010/08892), CFX-96 (Bio-Rad, США, ФСЗ 2008/03399), RotorGene (Qiagen, Германия, ФСЗ 2010/07595), DTprime (ДНК-Технология, Россия, ФСР 2011/10229), QuantStudio5 (Thermofisher, США, РЗН 2019/8446) (см. п. 5.1 настоящей инструкции).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции (регистрация роста сигнала, рисунок 1, 2) 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.



Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналу **ROX** (Orange) относительно отрицательного контроля означают регистрацию роста сигнала и свидетельствует о наличии специфических фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 в данной микропробирке (рисунок 1).



Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **Cy5** в случае отсутствия положительной динамики по каналу **ROX** (Orange) означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном прохождении реакций ОТ и ПЦР-РВ, и подтверждает отсутствие специфических фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 в данной микропробирке (рисунок 2).

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу **FAM** (Green) в случае отсутствия положительной динамики по каналу **ROX** (Orange) означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, и дополнительно подтверждает отсутствие специфических фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 в данной микропробирке (рисунок 2).

7.3 Учет результатов анализа

Результаты анализа не подлежат учету:

- в случае регистрации роста сигнала **ОКО (ОКО-В)** по каналу **ROX (Orange)** (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ПКО-nCoV** по каналу **ROX (Orange)** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ОКО-В** по каналам **FAM (Green)** и **Cy5 (Red)**, либо регистрации роста сигнала по каналам **FAM (Green)** и **Cy5 (Red)** с пороговыми циклами $C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)}$ более 30,0: $C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)} > 30$ (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирках с исследуемыми образцами по каналам **FAM (Green)⁸** и/или **Cy5⁸ (Red)**, либо в случае регистрации роста сигнала по каналам **FAM (Green)⁸** и **Cy5 (Red)⁸**, если значения пороговых циклов $C_{tFAM/Cy5}$ превышают значения пороговых циклов по соответствующим каналам для **ОКО-В** $C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)}$ более чем на 5 циклов: $C_{tFAM/Cy5} > C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)} + 5$ (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала **ОКО (ОКО-В)** по каналу **ROX (Orange)**;
- в случае регистрации роста сигнала **ОКО-В** по каналам **FAM (Green)** и **Cy5 (Red)** с пороговыми циклами $C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)}$ менее 30,0: $C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)} \leq 30$;
- в случае регистрации роста сигнала в исследуемых образцах по каналам **FAM (Green)⁹** и **Cy5 (Red)⁹**, если значения пороговых циклов $C_{tFAM/Cy5}$ не превышают значения пороговых циклов по соответствующим

⁸ В пробирках, имеющих регистрацию роста сигнала по каналу **ROX (Orange)**, допускается отсутствие регистрации роста сигнала, либо регистрация сигнала с величиной $C_{tFAM/Cy5} > C_{tFAM/Cy5(ОКО-В)} + 5$, либо низкая амплитуда кинетической кривой по каналам **Cy5 (Red)** и **FAM (Green)**.

каналам для ОКО-В $Ct_{FAM/Cy5(ОКО-В)}$ более чем на 5 циклов: $Ct_{FAM/Cy5} \leq Ct_{FAM/Cy5(ОКО-В)} + 5$;

- в случае регистрации роста сигнала **ПКО-nCoV** по каналу **ROX** (Orange) с любой величиной порогового цикла Ct .

Регистрация роста сигнала по каналу **ROX** (Orange) в пробирках с препаратом НК свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома коронавируса SARS-CoV-2. Величина порогового цикла Ct при этом не имеет значения.

Регистрация роста сигнала в пробирках с исследуемыми образцами по каналу **Cy5** (Red)⁹ с пороговым циклом $Ct_{Cy5} \leq Ct_{Cy5(ОКО-В)} + 5$ свидетельствует об успешном прохождении обратной транскрипции и ОТ-ПЦР-РВ в каждой конкретной микропробирке, большие значения Ct свидетельствуют об ингибировании ОТ-ПЦР-РВ.

Регистрация роста сигнала в пробирках с исследуемыми образцами по каналу **FAM** (Green)⁹ с пороговым циклом $Ct_{FAM} \leq Ct_{FAM(ОКО-В)} + 5$, свидетельствует об успешном выделении РНК из пробы, большие значения Ct свидетельствуют о потерях на этапе выделения РНК.

Интерпретация результатов анализа осуществляется в соответствии с таблицей 5.

⁹ В пробирках, имеющих регистрацию роста сигнала по каналу **ROX** (Orange), допускается отсутствие регистрации роста сигнала, либо регистрация сигнала с величиной $Ct_{FAM/Cy5} > Ct_{FAM/Cy5(ОКО-В)} + 5$, либо низкая амплитуда кинетической кривой по каналам **Cy5** (Red) и **FAM** (Green).

Таблица 5 – Интерпретация результатов анализа проб с помощью набора реагентов «ОТ-ПЦР-PB-SARS-CoV-2»

Результат ПЦР по каналу			Образец	Интерпретация
FAM (Green)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)		
Результаты всего анализа не подлежат учёту в любом из следующих случаев				
–	–	–	ПКО	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
–/+ Ct ≥ 30	–	–/+ Ct ≥ 30	ОКО-В	Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения, 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				
–/+ Ct > C _{токо-в} +5	–	–/+ Ct > C _{токо-в} +5	проба	Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов				
–	+	любой	ПКО	Набор реагентов специфичен в отношении РНК коронавируса SARS-CoV-2
+	–	+	ОКО-В	Контаминация отсутствует
Ct ≤ 30	–	Ct ≤ 30	ОКО	
–	–	+		
+	–	+	проба	В пробе не обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
Ct ≤ C _{токо-в} +5	–	Ct ≤ C _{токо-в} +5		В пробе присутствует РНК коронавируса SARS-CoV-2
любой	+	любой		

8 РАСЧЕТЫ

8.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ОТ-ПЦР-PB и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например, программа АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М» или Bio-Rad CFX Manager 3.1

и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 21.20.23-003-97313483-2021: комплект «М-Сорб-НК» – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С; комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» – в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 16 до минус 20 °С; комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л» – в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Суммарный срок хранения комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ, вариант исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2», при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не должен превышать 5 суток в течение срока годности набора реагентов.

Суммарный срок хранения комплекта «М-Сорб-НК» и комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л» при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

9.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» должно производиться в соответствии с ТУ 21.20.23-003-97313483-2021 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным): комплект «М-Сорб-НК» при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С; комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л» при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование комплекта «М-Сорб-НК» и комплекта для проведения

ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2-Л» до 14 суток при температуре до плюс 20 °С (без соблюдения «холодовой цепи»).

Транспортирование комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» должно производиться в соответствии с ТУ 21.20.23-003-97313483-2021 крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от минус 16 до минус 20 °С с соблюдением требований «холодовой цепи» в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой. Допускается транспортирование комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» до 5 суток при температуре до плюс 8 °С с соблюдением требований «холодовой цепи» в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой.

После получения набор «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» в форме выпуска 1, содержащей комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения жидкой реакционной смеси «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2», необходимо разукomплектовать на составляющие комплекты «М-Сорб-НК» и «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» для дальнейшего хранения и использования.

9.3 Условия эксплуатации и срок годности набора

Набор реагентов должен применяться согласно утвержденной инструкции по применению. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

Срок годности набора реагентов составляет 18 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

9.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ и автоматической станции после выделения РНК, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09) и утилизации по классу Б, как эпидемиологически опасные отходы (СанПиН 2.1.7.2790-10).

Комплекты «М-Сорб-НК» набора «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

Компоненты набора «Лизирующий раствор, ЛОР», классифицирующийся как опасный, и «Реакционная смесь PC-SARS-CoV-2», «Раствор для разбавления фермента, РФ», «Разбавитель, РБ», содержащие азид натрия, утилизируются путем смыва их в водопроводно-канализационную систему с предварительным разведением водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный и бытовой мусор.

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе после проведения ОТ-ПЦР-РВ, 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.

Комплекты для проведения ОТ-ПЦР-РВ набора «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, а также являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, зарегистрированных в Российской Федерации, а также изделия,

обнаруженные и конфискованные таможенными органами Российской Федерации при их ввозе на территорию Российской Федерации, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (18 месяцев), при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ- SARS-CoV-2» направлять на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол»: г. Москва, 125499, Кронштадтский бульвар, д. 39, к. 1, тел. (495)984-69-93, факс. (499)977-74-55, Email: syntol@syntol.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 ООО «НПФ Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

10. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для <i>in vitro</i> диагностики
	Температурный диапазон
	Годен до
	Код партии (серия)
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света
	Количество тестов (определений)
	«Восклицательный знак» Сигнальное слово: «Осторожно» Химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи H302: Вредно при проглатывании H332: Вредно при вдыхании H315: При попадании на кожу вызывает раздражение Химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение



«Жидкости, выливающиеся из двух пробирок и поражающие металл и руку»

Сигнальное слово: «Осторожно»

Химическая продукция, вызывающая коррозию металла

H290: Может вызывать коррозию металлов

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Временные методические рекомендации профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) утв. Минздравом России, Роспотребнадзором.

2. Временные методические рекомендации по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (SARS-CoV-2) 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.

Научный директор ООО «НПФ Синтол»



Алексеев Я.И.

«__» _____ 2021

СОГЛАСОВАНО:

с.н.с. отдела микробиологии к.м.н.



Смирнова Т.Г.

«__» _____ 2021

Прошито, пронумеровано,
проброшкоровано 45 листов

Генеральный директор
ООО «НПО Синтол»

А.В.Кузубов

