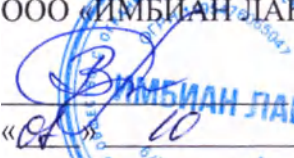


ОКПД2 21.20.23.110



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «ИМБИАН ЛАБ»


В.В. Осипова
«04» 10 2021 г.

Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

**Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом
полимеразной цепной реакции в реальном времени «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН»,
ТУ 21.20.23-062-41390295-2021**

1

Содержание

- 1. Назначение и порядок использования набора реагентов**
- 2. Характеристика набора**
- 3. Аналитические и диагностические характеристики**
- 4. Меры предосторожности при работе с набором**
- 5. Оборудование и материалы, необходимы при работе с набором**
- 6. Анализ пробы**
- 7. Проведение анализа**
- 8. Расчеты**
- 9. Условия транспортирования, хранения и эксплуатации набора**
- 10. Символы, используемые при маркировке набора**

1. Назначение и порядок использования набора реагентов

Полное наименование набора

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН», ТУ 21.20.23-062-41390295-2021.

Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов предназначен для качественного выявления 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 методов амплификации нуклеиновых кислот (далее – МАНК) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание).

Область применения набора

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

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

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 исключающих 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).

Противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты

В ходе менеджмента риска установлено, что применение изделия для диагностики *in vitro* «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» 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.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» 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-РВ анализа «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС».

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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН -Л».

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

Форма 4 включает комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ анализа «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН -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 необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, зарегистрированные в установленном порядке.

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 выделений. Комплект реагентов состоит из 5 реагентов.

№	Реагент	Описание	Объем	Кол-во
1.	Лизирующий раствор, Лир	Прозрачная бесцветная жидкость	50мл	1 флакон
2.	Сорбирующий раствор, СР	Суспензия с осадком темно-коричневого цвета	4мл	1 флакон
3.	Промывочный раствор, ПР-А4	Прозрачная бесцветная жидкость	65 мл	1 флакон
4.	Элюирующий раствор, ЭР	Прозрачная бесцветная жидкость	18 мл	1 флакон
5.	Отрицательный контрольный образец выделения. ОКО-В	Прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка

2.2.2 Комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ

2.2.2.1 Вариант исполнения «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС»

Комплект реагентов состоит из 7 реагентов.

Комплект в варианте исполнения жидкой реакционной смеси рассчитан на проведение 96 реакций, включая контрольные образцы.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, РС-SARS-CoV-2	прозрачная светло-сиреневая жидкость	1,5 мл	1 пробирка
2.	Внутренний положительный контроль обратной транскрипции, ВПК-ОТ	прозрачная бесцветная жидкость	0,02 мл	1 пробирка
3.	Смесь ферментов, Е-Mix	сухое вещество белого цвета		1 пробирка
4.	Разбавитель фермента, РФ	прозрачная бесцветная жидкость	0,112 мл	1 пробирка
5.	Положительный контрольный образец, ПКО-nCov	сухое вещество белого цвета		1 пробирка
6.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
7.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка

2.2.2.2 Вариант исполнения «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-Л»

Комплект реагентов состоит из 4 реагентов.

Комплект в варианте исполнения лиофилизированной реакционной смеси рассчитан на проведение 96 реакций, включая контрольные образцы.

№	Состав комплекта	Описание	Объем	Кол-во
1	Реакционная смесь в лунках микропланшета, РС- SARS-CoV-2-Л	сухое вещество белого цвета	-	Микропланшет 96 лунок

2	Положительный контрольный образец, ПКО-пС ov	сухое вещество белого цвета	-	1 пробирка
3	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
4	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В РНК	прозрачная бесцветная жидкость	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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» 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 флуоресцентных зонда (FAM, R6G, 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, 48)» (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 мультимплексной 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; R6G и ROX - коронавирус SARS-CoV-2; 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.

2.4 Ограничения метода

В ходе клинических испытаний 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.

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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» 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 *orf1ab* 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 «ИМБИАН ЛАБ» 630559, Новосибирская область, г.о. рабочий поселок Кольцово, р.п. Кольцово, ул. Садовая, дом 2/7, этаж 2, помещение 2, тел. +7(383)209-34-54, info@imbian.ru, www.imbian.ru. Полученный ПЦР-продукт секвенируют методом Сентера.

Аналитические и диагностические характеристики

3. Аналитические характеристики

В ходе проведения клинико-лабораторных были подтверждены заявленные функциональные характеристики медицинского изделия. Чувствительность, специфичность и воспроизводимость набора реагентов определяли на препаратах, содержащих НК возбудителей респираторных инфекций: коронавируса SARS-CoV-2 штамм ГК2020/1; 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-синцитиальный вирус (РСВ) штамм «hRSV-1», аденовируса 5 типа человека, риновируса человека штамм «Рино/la/Ленинград/78», метапневмовируса человека штамм «НМ-1», коронавируса человека штамм «Lp/Ленинград/2/77», вируса парагриппа 1 типа штамм «Сендай», *Streptococcus pneumoniae* штаммы CCBH-101/14, ATCC49619, *Haemophilus influenzae type B* штамм ATCC49247.

3.1 Чувствительность

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

3.1.1 Специфичность

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

3.2 Диагностические характеристики

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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН», ТУ 21.20.23-062-41390295-2021» для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из клинического материала методом сорбции на магнитных частицах, 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%). Эффективность выделения РНК комплектом реагентов «М-Сорб-НК», входящим в состав формы выпуска 1 и формы выпуска 2 сопоставима с референтным набором для выделения РНК.

Выделение РНК комплектом реагентов «М-Сорб-НК» не приводит к потерям на этапе выделения РНК. Ингибирования ОТ-ПЦР после выделения РНК комплектом реагентов «М-Сорб-НК» не наблюдалось.

Доказана полная согласованность результатов, полученных с использованием представленного для испытаний набора «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» и референтными наборами.

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, ЛнР» 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.

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

Применение изделия для диагностики *in vitro* «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» 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, необходимы при работе с набором

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ - зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам) - Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции «АНК» по ТУ 9443-003-04699534-2005 (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург; ФСР 2010/08892), Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (Bio-Rad, США; ФСЗ 2008/03399), Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, с принадлежностями (Qiagen, Германия; ФСЗ 2010/07595), Амплификатор детектирующий "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6, 4X1, 5X1, 6X1 (ДНК-Технология, Россия; ФСР 2011/10229), Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени варианты исполнения (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 (далее - ШББ) не ниже 2.

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, 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;

Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин;

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок;

Отсасыватель медицинский;

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

Магнитный штатив;

Холодильник на 2-8°C.

5.4.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях

Холодильник на 2-8°C.

5.4.3 Для постановки ОТ-ПЦР-РВ

Микроцентрифуга-вортекс 201;

Микроцентрифуга для микропланшета;

Штатив типа «IsoFreeze»;

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

Штатив для работы с микропланшетом;

Холодильник/морозильник на 2-8 °C/минус 16-20 °C.

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

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

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

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

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 1000мкл;

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

6. Анализ пробы

6.1 Тип исследуемых образцов

Биологическим материалом для исследования являются: материал, полученный
при взятии мазков со слизистой носо- и ротоглотки, мокроты, промывных
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 (далее - СИЗ).

Мазок из носоглотки или ротоглотки (зева) берется стерильным тампоном, который после взятия материала помещается в стерильную пластиковую пробирку с транспортной средой (раствор натрия хлорид 0,9%). 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 закручивающейся 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

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 Cy5 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	Транспортировка	Условия хранения до	Комментарий
-------------	--------------------	-----------------	---------------------	-------------

	материала		тестировани я	
Мазок с носоглотки зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков	4°C	<=5 дней: 4°C >5 дней<*>: - 70°C	Носоглоточные и орофарингеаль ные тампоны
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер	4°C	<=48 часов: 4°C>48 часов<*>: - 70°C	Возможно небольшое разделение образца
Эндотрахеальный аспира́т, аспира́т носоглотки или смыв из носа	Стерильный контейнер	4°C	<=48 часов: 4°C>48 часов<*>: - 70°C	
Мокрота	Стерильный контейнер	4°C	<=48 часов: 4°C>48 часов<*>: - 70°C	Убедитесь, что материалы поступают из нижних дыхательных путей

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 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 2.1.3684-21).

7. Проведение анализа

7.1 Выделение РНК комплектом «М-Сорб-Н:К»

Процедуру выделения РНК с помощью комплекта «М-Сорб-Н:К» 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! Если при выполнении какой-либо операции во время выделения РНК произошла «авария» (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца попали на рабочую поверхность и т.д.), необходимо сменить перчатки и провести дезинтационные 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.

1. 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 ЛиР 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 ЛиР 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 ЛиР, 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.

2. 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 2 мин. при 10 тыс.об/мин¹;

-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.

3. 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!

4. 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 ЛиР, внутренний положительный контроль выделения ВПК-В-РНК и сорбирующий раствор СР. Тщательно перемешивают;

-Вносят в лунки рабочего планшета 1 по 550 мкл готовой смеси

ЛиР+ВПК-В-РНК+СР;

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором ЛиР 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);

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.

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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС»

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

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

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 определение	на каждый анализ
Реакционная смесь, PC-SARS-Co V-2	15 мкл	15 x (N ² +2) мкл, где N - количество исследуемых образцов; 2 - контроли ³ (П:КО, ОКО)
ВПК-ОТ	0,2 мкл	0,2 x (N+2)
Е-Mix	1 мкл	1 x (N+2)
ПКО-нCoV	-	20мкл
ОКО	-	20мкл

- Размораживают пробирки с реакционной смесью PC-SARS-Co V-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-нCoV добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных 20 °С в течение срока годности набора реагентов;

В пробирку с сухим содержимым Е-Mix добавляют 110 мкл РФ, перемешивают пипетированием до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенного препарата Е-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 типа «IsoFreeze» 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 Е-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 типа «IsoFreeze»;

Вносят в подготовленные 0,2 мл пробирки по 20 мкл ОКО, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО-нCoV, 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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-Л»

Реагент	Расход реагентов	
	на 1 определение	на каждый анализ
Микропланшет с PC-SARS-CoV-2-Л	1 пробирка	$N+2$, где N - количество исследуемых образцов; 2 - контроли (ПКО, ОКО)
ПКО-пCoV	-	20мкл
ОКО	-	20мкл

- Комплект реагентов извлекают из холодильника;

Размораживают пробирки с раствором для разбавления ПКО и 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-пCoV добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин. Хранение разведенных препаратов ПКО-пCoV допускается при температуре не выше минус 20 °С в течение срока годности набора реагентов;

Отбирают необходимое число микропробирок с MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-Л, устанавливают в штатив типа «IsoFreeze» и маркируют в соответствии с протоколом исследования;

Открывают крышки микропробирок и вносят в пробирки по 35 мкл ОКО, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО-пCoV, плотно закрывают крышки;

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

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

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), R6G (HEX, Yellow), ROX (Orange) и Cy5 (Red). Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Green - 4, Yellow -5, Orange - 5, Red- 7;

Таблица 4 - Температурно-временной режим амплификации

№п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
------	------------------------------	-------------------

1	50 °C - 900 секунд	1
2	95 °C - 300 секунд	1
3	95 °C - 10 секунд	50
4	58 °C- 10 секунд Считывание сигнала флуоресценции	
5	C - 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. 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.

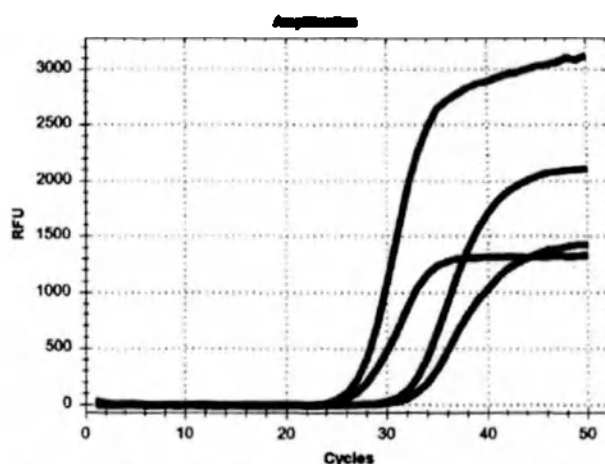


Рисунок 1 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналам HEX, ROX, FAM, Cy5 – положительный результат на коронавирус SARS-CoV-2 (CFX-96)

HEX - — ROX - —
FAM - — Cy5 - —

Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналам R6G (HEX, Yellow) и/или 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).

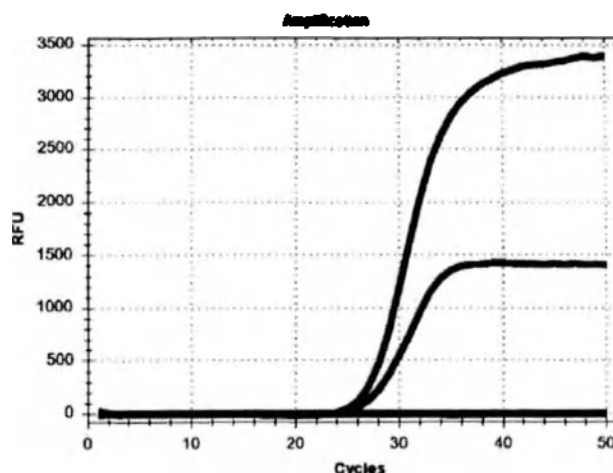


Рисунок 2 - Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции по каналам HEX, ROX, FAM, Cy5 – отрицательный результат на коронавирус SARS-CoV-2 (CFX-96)
FAM – — Cy5 – - - -

Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции по каналу Cy5 в случае отсутствия положительной динамики по каналам R6G (HEX, Yellow) и ROX (Orange) означает регистрацию роста сигнала и свидетельствует об успешном прохождении реакций ОТ-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 R6G (HEX, Yellow) и 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 R6G (HEX, Yellow) и/или ROX (Orange) (ложноположительный результат всего эксперимента). Величина порогового цикла C_t при этом не имеет значения;
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ПКО-пCoV по каналу R6G (HEX, Yellow) и/или 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}/C_{tCy5} (ОКО-В) более 30,0: C_{tfam}/C_{tCy5} (ОКО-В) > 30 (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- в случае отсутствия регистрации роста сигнала в пробирках с исследуемыми образцами по каналам FAM (Green) и/или Cy5 (Red), либо в случае регистрации роста сигнала по каналам FAM (Green) и Cy5 (Red), если значения пороговых циклов C_{tfam}/C_{tCy5} превышают значения пороговых циклов по соответствующим каналам для ОКО-В C_{tfam}/C_{tCy5} (ОКО-В) более чем на 5 циклов: $C_{tfam}/C_{tCy5} > C_{tfam}/C_{tCy5} (\text{око-в}) + 5$ (ложноотрицательный результат в конкретной микропробирке).

Результаты анализа подлежат учету:

- в случае отсутствия регистрации роста сигнала ОКО (ОКО-В) по каналам R6G (HEX, Yellow) и ROX (Orange);
- в случае регистрации роста сигнала ОКО-В по каналам FAM (Green) и Cy5 (Red) с пороговыми циклами C_{tfam}/C_{tCy5} (ОКО-В) менее 30,0: C_{tfam}/C_{tCy5} (ОКО-В) ≤ 30 ;

- В случае регистрации роста сигнала в исследуемых образцах по каналам FAM (Green)¹⁰ и Cy5 (Red)¹⁰ если значения пороговых циклов Ct_{FAM/Cy5} не превышают значения пороговых циклов по соответствующим каналам для ОКО-В Ct_{FAM/Cy5 (ОКО-В)} более чем на 5 циклов: Ct_{FAM/Cy5} > Ct_{FAM/Cy5 (ОКО-В)}+5;

- В случае регистрации роста сигнала ПКО-нCoV по каналам R6G (HEX, Yellow) и ROX (Orange), с любой величиной порогового цикла Ct.

Регистрация роста сигнала по каналам R6G (HEX, Yellow) и/или 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)¹⁰ с пороговым циклом Ct_{Cy5}; Ct_{FAM/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)¹⁰ с пороговым циклом Ct_{FAM} ≤ 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.

Таблица 5 - Интерпретация результатов анализа проб с помощью набора реагентов «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН»

Результат ПЦР по каналу				Образец	Интерпретация
FAM (Green)	R6G (HEX, Yellow)	ROX (Orange)	Cy5 (Red)		
Результаты всего анализа не подлежат учёту, в любом из следующих случаев					
-	- по любому из каналов	-	ПКО	Ложноотрицательный результат, ингибирование ОТ-ПЦР-РВ	
-/+ Ct 30	-	-/+ Ct 30	ОКО-В	Ложноотрицательный результат, недостаточная эффективность выделения, ингибирование ОТ-ПЦР- РВ	
любой	+ по любому из каналов	любой	ОКО-В	Ложноположительный результат, контаминация в процессе выделения НК	
	+ по любому из каналов		ОКО	Ложноположительный результат, контаминация в ходе постановки ОТ-ПЦР-РВ	
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы					
-/+ Ct > Ct _{ОКО-В} +5	-	-/+ Ct > Ct _{ОКО-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	
+ Ct<30	-	+ Ct<30	ОКО-В	Контаминация отсутствует	
-	-	+	ОКО		
+ Ct < Ct _{ОКО-В} +5	-	+ Ct < Ct _{ОКО-В} +5	проба	В пробе не обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2	
любой	+	любой		В пробе присутствует РНК коронавируса SARS-CoV-2	
	+				
	-				

8 Расчеты

8.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителем прибора, например, программа АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М», «АНК-48» или Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемая с прибором CFX-96. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

9. Условия ранения, транспортирования и эксплуатации набора

9.1 Условия хранения набора

В соответствии с ТУ 21.20.23-062-41390295-2021: 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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС» - в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 16 до минус 20 °С; комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС», 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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-Л» при температуре от плюс 9 до плюс 20 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

В соответствии с ТУ 21.20.23-062-41390295-2021: 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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС» - в сухом, защищенном от света месте при температуре от минус 16 до минус 20 °С; комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС», 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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» должно производиться в соответствии с ТУ 21.20.23-062-41390295-2021 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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС» при температуре от минус 16 до минус 20 °С; комплект для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-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 «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-Л» до 14 суток при температуре до плюс 20 °С; комплекта для проведения ОТ-ПЦР-РВ в варианте исполнения «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН-РС» до 5 суток при температуре до плюс 8 °С.

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

9.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 14 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 2.1.3684-21).

Комплекты «М-Сорб-НК» набора «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.3684-21).

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 2.1.3684-21.

Комплекты для проведения ОТ-ПЦР-РВ набора «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.3684-21).

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 (14 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН» направлять на предприятие-изготовитель ООО «ИМБИАН ЛАБ» 630559,

Новосибирская область, г.о. рабочий поселок Кольцово, р.п. Кольцово, ул. Садовая, дом 2/7, этаж 2, помещение 2, тел. +7(383)209-34-54, info@imbian.ru, www.imbian.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 «ИМБИАН ЛАБ» 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
	Дата истечения срока годности
	Номер серии
	Каталожный номер
	Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления
	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

Штрих-код

Форма выпуска №1 Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН», ТУ 21.20.23-062-41390295-2021 – 4620102801631;

Форма выпуска №2 Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН», ТУ 21.20.23-062-41390295-2021 - 4620102801655;

Форма выпуска №3 Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН», ТУ 21.20.23-062-41390295-2021 – 4620102801662;

Форма выпуска №4 Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «MAG-SARS-CoV-2-ИМБИАН», ТУ 21.20.23-062-41390295-2021 – 4620102801679.

†

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

24 лист 2

Генеральный директор

ООО «ИМБИАН ЛАБ»

В.В. Осипова

"05" 10 2021 г

