

20 1055
BIO-RAD

Date _____

From Bio-Rad Laboratories, Inc.

We Bio-Rad Laboratories, Inc. registered at the following address 5731 W. Las Positas Blvd PLEASANTON, CA 94588 UNITED STATES, hereby confirm that the attached operating instruction in Russian is correct and that its content is valid.

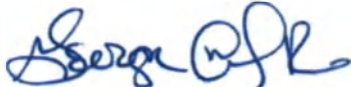
Sincerely,


Signature

Mario Wijker / 21 June 2021

Position

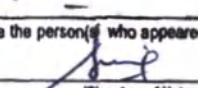
Senior Vice President of Quality Assurance and Regulatory Affairs

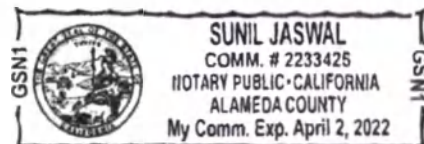
Authorized Signature: 
13-Jul-2021
George De La Rosa

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

STATE OF CALIFORNIA COUNTY OF ALAMEDA
Subscribed and sworn to (or affirmed) before me on this
13 day of July, 2021 by George De La Rosa

proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) who appeared before me.


(Signature of Notary)





Инструкция по применению

Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 ("SARS-CoV-2 ddPCR Kit") методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в биологическом материале, в составе

IVD

 Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк.",
5731 W. Las Positas Blvd PLEASANTON, CA 94588 UNITED
STATES, США

5731 В Лас Поситас Бульвар, Плезантон, штат Калифорния,
94588, США

  **Франция, «Био-Рад», 3 бульвар Раймона Пуанкаре, 92430**
Мартен-ля-Кокетт, Франция. Тел.: +33 (0)1 47 95 60 00

Наименование медицинского изделия

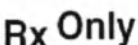
Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 ("SARS-CoV-2 ddPCR Kit") методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в биологическом материале, в составе

Далее по тексту: Изделие, набор реагентов, Набор SARS-CoV-2, наборы SARS-CoV-2 ddPCR, Тест Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR, Набор Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR

ПЕРЕВОДЫ

Возможно предоставление документации на изделия на других языках на электронных носителях.

ОПИСАНИЕ СИМВОЛОВ

 Европейский знак соответствия	 Производитель	 Уполномоченный представитель в ЕС
 Номер партии	 Дата окончания срока годности:	 Для использования в диагностике in vitro
 Температурное ограничение	 Каталожный номер	 См. Инструкции по применению
 Количество тестов	 Для использования с	 Серийный №
 Только по рецепту	 Содержит латекс	 Уникальная идентификация изделия – Идентификатор изделия

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

За помощью и технической консультацией обращайтесь в Отдел технической поддержки ООО «БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ».

Телефон: (495) 721 14 04, diag_support_rcis@bio-rad.com, www.bio-rad.com

Техническая поддержка онлайн и контактная информация по всему миру доступны на сайте www.consult.bio-rad.com, diag_support_rcis@bio-rad.com, www.bio-rad.com

ПРАВОВЫЕ УВЕДОМЛЕНИЯ

Никакая часть данной публикации не может воспроизводиться или передаваться в какой-либо форме или какими-либо средствами (электронными или механическими), включая копирование, запись или любую систему хранения или поиска информации, без письменного разрешения Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториз, Инк."

Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториз, Инк." оставляет за собой право видоизменять свои товары/услуги в любое время. Внесение изменений в настоящее руководство происходит без уведомления. Несмотря на то, что текст составлен для обеспечения точности информации, компания Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториз, Инк." и ООО «БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ» не несет ответственность за ошибки или какие-либо убытки, понесенные в результате применения или использования данной информации.

BIO-RAD, DDPCR, DROPLET DIGITAL, DROPLET DIGITAL PCR, и QUANTASOFT являются товарными знаками «Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк." в некоторых юрисдикциях.

Все использующиеся в настоящем документе товарные знаки являются собственностью соответствующих правообладателей.

На изделие и (или) его использование распространяется действие патентов США и/или заявок на патенты США и других стран, принадлежащих или имеющих лицензию компании Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк." Приобретение данного изделия включает в себя ограниченное, не подлежащее передаче право согласно соответствующему законодательству об интеллектуальной собственности на использование изделия только в исследовательских и диагностических целях. Только для целей противостояния COVID-19 Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк." предоставляет права на использование изделия в коммерческих целях любого рода, включая, помимо прочего, производство, контроль качества или коммерческое обслуживание, такое как подрядные услуги или плата за услуги. Информация о лицензии на использование в подобных целях может быть получена у компании Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк.". Для любых целей, помимо тестирования COVID-19, покупатель или конечный пользователь несет ответственность за приобретение любых дополнительных прав интеллектуальной собственности, которые могут потребоваться.

Приобретение изделий Цифровой ПЦР у Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк." включает в себя ограниченное непередаваемое право в рамках нашей интеллектуальной собственности на использование вами изделий только для внутренних исследовательских целей. Если иное прямо не указано в дополнительных Условиях, вам не предоставляются никакие права на распространение, перепродажу и использование изделий в коммерческих целях, таких как договорные услуги или оплата услуг. Не предоставляются права для использования изделия в диагностических целях. Информация о лицензии на использование в подобных целях может быть получена у компании Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк."

Покупатель или конечный пользователь обязан приобрести любые требуемые дополнительные права на интеллектуальную собственность. На Системы капельной цифровой ПЦР AutoDG QX ONE/QX200/QX100/QX200 и (или) их использование распространяются патентные заявки США и (или) находящиеся на рассмотрении патентным заявками США и других стран, принадлежащие Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк." или принадлежащие ей по лицензии. См. подробности на bio-rad.com/en-us/trademarks.

Предупреждения и меры предосторожности по набору SARS-CoV-2 ddPCR

Для диагностики *in vitro*. Для использования медицинскими работниками.

К работе с данным набором для анализа допускаются только квалифицированные сотрудники, обученные методике лабораторных исследований и знакомые с их потенциальными опасностями. Носите соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз или лица и обращайтесь со средой надлежащим образом согласно требованиям Правил лабораторной практики.

Поместите оборудование рядом с заземленной розеткой, чтобы вилка доставала до источника питания. В качестве разъединителя используется вилка на блоке питания.

Для подъема автоматизированного генератора капель QX200 или QXDx потребуются два человека. Схватить снизу, по одному человеку с каждой стороны.

Внутри нет обслуживаемых частей.

Обучение по СИЗ (средствам индивидуальной защиты)

Рекомендуется правильное использование перчаток при использовании масел и планшетов с образцами. Требования Федерального агентства по охране труда и здоровья (OSHA) для СИЗ приведены в Своде федеральных правил (CFR) в 29 CFR 1910.132 (Общие требования); 29 CFR 1910.138 (Защита рук); 29 CFR 1926.95 (Критерии для стандартных средств индивидуальной защиты). Перчатки с нарушенными защитными свойствами нужно выбросить и заменить. Принимая решение о повторном использовании перчаток, подвергшихся воздействию химикатов, учитывайте токсичность химических веществ и такие факторы, как продолжительность воздействия, хранение и температура.

Свойства, облегчающие выбор перчаток для работы с механизмами, пробами, маслами и очищающими растворителями:

Бутиловые перчатки изготовлены из синтетического каучука и защищают от перекиси, плавиковой

кислоты, сильных оснований, спиртов, альдегидов и кетонов.

Перчатки из натурального (латексного) каучука удобны в носке и отличаются первоклассной прочностью на растяжение, эластичностью и термостойкостью.

Неопреновые перчатки изготовлены из синтетического каучука, имеют отличную сгибаемость и обеспечивают ловкость пальцев; перчатки обладают высокой плотностью и сопротивлением на разрыв; они защищают от спиртов, органических кислот и щелочей.

Нитриловые перчатки изготовлены из сополимера и обеспечивают защиту от хлорированных растворителей, например, трихлорэтилена и тетрахлорэтана; они обеспечивают защиту при работе с маслами, смазками, кислотами и едкими веществами.

НАЗНАЧЕНИЕ

Изделие предназначено для качественного определения РНК вируса SARS-CoV-2 в препаратах нуклеиновых кислот, выделенных из проб, полученных при взятии мазка из носоглотки и ротоглотки, методом цифровой каплевой ПЦР (ddPCR) с использованием обратной транскрипции, у лиц с клинической симптоматикой COVID-19 с подозрением на инфекцию SARS-CoV-2. Для диагностики *in vitro*. Для профессионального применения.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая и лабораторная диагностика

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Изделие предназначено для качественного определения РНК вируса SARS-CoV-2 в препаратах нуклеиновых кислот, выделенных из проб, полученных при взятии мазка из носоглотки и ротоглотки, методом цифровой каплевой ПЦР (ddPCR) с использованием обратной транскрипции, у лиц с клинической симптоматикой COVID-19 с подозрением на инфекцию SARS-CoV-2. Для диагностики *in vitro*. Для профессионального применения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Не применимо.

ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

Тест Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR предназначен для использования квалифицированным персоналом клинической лаборатории, прошедшим специальное обучение и получившим инструктаж по методике ddPCR и диагностическим процедурам *in vitro*.

КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 ("SARS-CoV-2 ddPCR Kit") методом цифровой каплевой ПЦР (ddPCR) в биологическом материале, в составе:

1. Смесь праймеров и зондов для детекции РНК вируса SARS-CoV-2, 600 мкл – 1 шт.
2. Обратная транскриптаза по 1 мл – 6 шт.
3. DTT Дитиотрейтол 300 мМ по 1 мл – 6 шт.
4. Смесь реагентов для проведения одноступенчатой реакции RT-ddPCR для зондов, по 1 мл – 6 шт.
5. Контрольный материал SARS-CoV-2 Positive (положительный), по 0,3 мл – 2 шт.
6. Контрольный материал SARS-CoV-2 Negative (отрицательный), по 0,3 мл – 2 шт.
7. Инструкция по применению – 1 шт

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР С ПОЯСНЕНИЯМИ

Вспышка пневмонии, вызванная новым коронавирусом (SARS-CoV-2) была выявлена в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай; сообщение о ней поступило в ВОЗ 31 декабря 2019 года. Быстрое распространение SARS-CoV-2 во многих регионах мира требует со стороны медицинских и лабораторных учреждений готовности и способности реагировать. Наличие специфических и чувствительных тестов на вирус имеет принципиальное значение для точной диагностики случаев, оценки серьезности вспышки, мониторинга стратегий вмешательства и исследований службы надзора. Тест Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR представляет собой молекулярный тест для диагностики *in vitro* и содержит реагенты, необходимые для проведения теста каплевой цифровой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-ddPCR). Наборы праймеров и зондов SARS-CoV-2 предназначены для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в образцах мазков из носоглотки, переднего носового отдела и средней носовой раковины, а также в образцах смыва/аспирата из носоглотки и аспирата из носовой полости, взятых у пациентов с признаками и симптомами инфекции с подозрением на COVID-19. Дополнительные процедуры тестирования и подтверждения должны выполняться после консультации с органами здравоохранения и (или) другими органами власти, которым требуется предоставлять отчетность. О положительных результатах также следует сообщать в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами. Степень эффективности у бессимптомных пациентов неизвестна.

ПРИНЦИП ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Набор SARS-CoV-2 ddPCR компании Био-Рад представляет собой тест на основе метода цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ddPCR) с обратной транскрипцией (ОТ), предназначенный для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 из проб, полученных при взятии мазка из носоглотки, переднего и среднего отдела полости носа, а также проб аспиратов/смыслов из носоглотки и проб назальных аспиратов у лиц с подозрением на COVID-19.

Для детекции SARS-CoV-2 используются те же олигонуклеотидные праймеры и зонды, что и приведены ЦКЗ, которые выделены из областей гена нуклеокапсидного (N) белка вируса. Набор предназначен для специфического определения 2019-nCoV (два комплекта праймер/зонд). Также в набор для проведения теста дополнительно включен комплект праймер/зонд для выявления в контрольных образцах и клинических пробах гена РНКазы Р человека. В набор SARS-CoV-2 ddPCR компании Био-Рад в один мультиплексный анализ входит три комплекта праймеров/зондов с целью проведения реакции в одной лунке.

Выделенная и очищенная РНК из проб, полученных при взятии мазка из носоглотки, переднего и среднего отдела полости носа, а также проб аспиратов/смыслов из носоглотки и проб назальных аспиратов, добавляется в мастер-микс, в состав которого входит обратная транскриптаза, таким образом РНК превращается в кДНК и затем амплифицируется с использованием супермикса для проведения одноступенчатой реакции RT-ddPCR, входящего в состав набора.

Смесь образца и супермикса для проведения одноступенчатой реакции RT-ddPCR фракционируют с использованием Генератор капель автоматический «Automated Droplet Generator» для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR), с принадлежностями, в составе (далее по тексту автоматизированный генератор) для получения капель размером до 20000 нанолитров в форме эмульсии «вода-в-масле». Затем эмульсию термоциклируют для проведения обратной транскрипции с образованием кДНК, после чего в каждой капле проходит амплификация мишени и гидролиз зонда. После ПЦР интенсивность флуоресценции каждой капли измеряется на двух каналах Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флуоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР с принадлежностями, в составе (красители FAM и HEX). Затем с помощью программного обеспечения QuantaSoft v1.7 и программного обеспечения QuantaSoft Analysis Pro v1.0 проводят анализ данных флуоресценции для определения наличия генов N1 и N2 вируса SARS-CoV-2 в образце.

Двадцать два микролитра (22 мкл) каждого готового образца для проведения RT-ddPCR загружают в лунки 96-луночного планшета для ПЦР. Планшет и необходимые расходные материалы загружают в автоматизированный генератор капель QX200. Необходимые расходные материалы: масло для автоматической генерации капель, планшеты для автоматизированного генератора капель, картриджи и наконечники для пипеток. В автоматизированном генераторе капель QX200 применяется технология микрофлюидики для объединения масла и водного образца с целью получения капель нанолитрового размера, которые необходимы для анализа методом ddPCR.

Готовый 96-луночный планшет для проведения RT-ddPCR, содержащий капли, сформированные автоматизированным генератором капель QX200, герметически запаивают фольгой с помощью планшетного запаивателя и подвергают термоциклированию с использованием термоциклеров C1000 Touch или S1000 компании Био-Рад.

После завершения термоциклирования готовый 96-луночный планшет для проведения RT-ddPCR загружают в Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флуоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР с принадлежностями, в составе (далее по тексту ридер капель). Ридер капель разделяет капли и пропускает их через флуоресцентный детектор с двухцветным сканированием. Детектор считывает капли и определяет, какие из них содержат мишень (положительные), а какие не содержат (отрицательные) в отношении каждой из мишеней, выявляемой с помощью теста ddPCR SARS-CoV-2: N1, N2 и РНКазы Р. Для анализа в системе ddPCR используется программное обеспечение QuantaSoft v1.7 и QuantaSoft Analysis Pro v1.0.

РАБОЧИЙ ПРОЦЕСС ТЕСТА BIO-RAD SARS-COV-2 DDPCR

Тест SARS-CoV-2 ddPCR предназначается для использования в системе капельной цифровой ПЦР Bio-Rad QX200 или QXDx AutoDG (ddPCR) (Таблица 1); рабочий процесс состоит из пяти этапов (Рисунок 1).

Таблица 1. Необходимые приборы

Наименование изделия
Система QD200 AutoDG ddPCR, IVD, в состав которой входит:
Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флуоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР, с принадлежностями, в составе, IVD
Генератор капель автоматический «Automated Droplet Generator» для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR), с принадлежностями, в составе, IVD

Рисунок 1. Рабочий процесс теста SARS-CoV-2 ddPCR на 96 проб

	Рабочий процесс	Прибор	Расчетное практическое время	Расчетное время по приборам
Этап 1	Выделение вирусной РНК из образцов мазков из передней части носовой полости и средней носовой раковины, а также из образцов смывов/аспирата из носоглотки и мазков аспирата, взятых из носовой полости.	Комплект ThermoFisher MagMAX для выделения вирусной/патогенной нуклеиновой кислоты или миникомплект QIAgen QIAamp Viral RNA Mini Или Автоматический процесс ThermoFisher MagMAX для выделения вирусной/патогенной нуклеиновой кислоты на KingFisher Flex System	<60 мин <10 мин	НД <30 мин
Этап 2	- Создание реакционных смесей, загрузка в генератор капель - Создание капель		<10 мин	~45 мин
Этап 3	Одношаговый протокол обратной транскрипции и амплификации	 или 	<10 мин	~210 мин
Этап 4	Считывание флуоресценции в Ридере капель		<5 мин	~120 мин

Этап 5	Анализ		<5 мин	<1 мин
--------	--------	---	--------	--------

РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ

Необходимые, но не предоставляемые материалы

Реагенты для очистки РНК

Набор ThermoFisher MagMAX (кат. № A48310, 1000 реакций) для выделения вирусной/патогенной нуклеиновой кислоты и мини набор QIAamp Viral (кат. № 52906, 250 реакций) одобрены для использования с набором ddPCR SARS-CoV-2 в соответствии с инструкциями производителя.

Общие реагенты и расходные материалы для капельной цифровой ПЦР

Материалы, необходимые для работы с системой QXDx ddPCR, но не предоставленные

Название	Кол-во (каждо о)	Объем	Условия хранения
Расходные материалы QXDx AutoDG	1	НД	от 15°C до 30 °C
Прокалываемая фольга для заклеивания планшетов ddPCR	50	НД	от 15°C до 30 °C
Планшеты ddPCR на 96 лунок	15	НД	от 15°C до 30 °C
Картриджи DG32 с уплотнениями	15	НД	от 15°C до 30 °C
Наконечники для пипеток для AutoDG (стойки)	10	НД	от 15°C до 30 °C
Масло AutoDG для зондов	1	50 мл	от 15°C до 30 °C
Масло в упаковке для ридера капель QXDx	1	1 л	от 15°C до 30 °C
Буферное управление ddPCR для зондов	1	2 x 4,5 мл	от 15°C до 30 °C

Контрольно-измерительные приборы, ПО и общее лабораторное оборудование

- Генератор капель автоматический «Automated Droplet Generator» для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR), с принадлежностями, в составе
- Набор расходных материалов «QXDx AutoDG Consumable Pack» для медицинского изделия "Генератор капель автоматический «Automated Droplet Generator» для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с принадлежностями"

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями (№ ФСЗ 2008/03399 от 21 июня 2016 года).
- Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флюоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР с принадлежностями, в составе

Необходимое общее лабораторное оборудование, не предоставленное в наборе Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR

Описание
Регулируемые пипетки (Rainin или Eppendorf)
1 – 10 мкл
10 – 100 мкл
20 - 200 мкл
100 – 1000 мкл
Регулируемые 8-канальные пипетки (Rainin или Eppendorf)
10 - 50 мкл, 10 - 100 мкл или 20 - 200 мкл
Микроцентрифуга
Центрифуга для планшета с микролунками
Вортекс-миксер

ОБЩИЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Результат теста должен интерпретироваться врачом вместе с клиническими данными и результатами других лабораторных тестов.
- Утилизация диагностических наборов: все образцы и использованные набор имеют инфекционный риск. При утилизации диагностических наборов соблюдаете местные законы об утилизации инфицированного оборудования или правила лаборатории.
- Организация лабораторной диагностики COVID-19 осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с микроорганизмами II групп патогенности.
- К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.
- Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности.
- Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности. Медицинские работники, которые собирают или транспортируют их в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать соответствующие средства индивидуальной защиты (СИЗ). При работе с образцами должны учитываться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».
- Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II группы патогенности.
- При работе с набором реагентов следует обращаться к Методическим рекомендациям МР 3.1.0169-20 Лабораторная диагностика COVID-19 (в редакции МР 3.1.0174-20 «Изменения № 1 в МР 3.1.0174-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», утвержденных Роспотребнадзором

30.04.2020).

- Для диагностики *in vitro* (IVD) в случае разрешения на использование в экстренных случаях.
- Только для профессионального использования.
- Положительные результаты указывают на присутствие РНК SARS-CoV-2.
- Лаборатории в США и на принадлежащих им территориях обязаны сообщать обо всех положительных результатах в соответствующие органы здравоохранения.
- Обработку всех биологических образцов следует осуществлять таким образом, как если бы они были способны передавать возбудителей инфекции, используя безопасные лабораторные процедуры, аналогичные представленным в публикации Министерства здравоохранения и социальных служб США (HHS) (CDC) 21-1112, Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях, а также в документе Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) M29-A4, Защита лаборантов от воздействия инфекционных заболеваний, передающихся через кровь, биологические жидкости и ткани.[1, 2]
- Выполняйте тщательную очистку и дезинфекцию всех рабочих поверхностей свежеприготовленным раствором 0,5% гипохлорита натрия (10% хлорная известь) в деионизированной или дистиллированной воде, а затем 70% спиртом.
- Чтобы свести к минимуму загрязнение нуклеиновой кислотой, выполняйте дезинфекцию рабочего места, пипетторов и оборудования на регулярной основе и изолируйте зону обработки образцов и РНК/ДНК от зоны проведения анализа.
- Оптимизируйте рабочий процесс и рабочее пространство, чтобы свести к минимуму риск загрязнения при переносе от завершённых реакций ПЦР.
- Убедитесь, что автоматический генератор и ридер капель установлены в специальных местах, отделённых друг от друга, во избежание загрязнения ампликона.
- Подготовку к процедуре анализа и добавление матриц в разных местах выполняйте с использованием разных пипетторов.
- При работе с химическими соединениями и биологическими образцами соблюдайте лабораторные правила техники безопасности.
- При работе с реагентами и их транспортировке меняйте защитные перчатки на регулярной основе.
- Несоблюдение процедур и условий, представленных в настоящем документе, может привести к получению неверных результатов и к неблагоприятным последствиям.
- Не заменяйте реагенты для теста Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR другими реагентами.
- Настройку или добавление матриц необходимо выполнять при отсутствии рибонуклеазы/дезоксирибонуклеазы.
- Убедитесь, что все оборудование проходит регулярное обслуживание и калибровку согласно инструкциям производителя.
- Используйте наконечники пипеток и реагенты, не содержащие нуклеазы; регулярно очищайте пипетторы.
- Для получения оптимальных результатов убедитесь, что используется только рекомендуемый протокол термоциклирования.
- Не используйте воду, обработанную диэтилпилокарбонатом, для амплификации ПЦР.
- Строго следуйте процедурам и рекомендациям для проведения тестирования надлежащим образом. Любые отклонения от процедур и рекомендаций могут повлиять на оптимальные характеристики теста.
- Отсутствие надлежащего контроля при переносе образцов в процессе их обработки может привести к ложноположительным результатам

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для получения точных результатов тестирования необходимо обеспечить надлежащий сбор, хранение и транспортировку образцов. Для обеспечения качества образцов и результатов настоятельно рекомендуется пройти обучение правильным процедурам сбора образцов. В качестве подходящего ресурса поддержки можно использовать стандарт CLSI MM13-A.

1. Критерии приемлемости образцов

- Сбор образцов необходимо осуществлять в стерильные пробирки с соответствующей маркировкой, с последующей отправкой пробирок в упаковках с замороженным гелем при температуре от 2°C до 8°C.

2. Критерии отбракованных образцов

- Образцы, которые не были предварительно одобрены для тестирования, и образцы с неправильной маркировкой, не подлежат тестированию до получения необходимой информации.

3. Сбор образцов

- См. внутренние рекомендации по сбору, обработке и тестированию клинических образцов пациентов,

исследуемых на носительство нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

- Соответствующие методики можно найти в инструкциях изготовителей устройства для сбора образцов.
- Образцы мазков следует собирать только тампонами с синтетическим наконечником, например, из нейлона или материала Dacron®, и алюминиевым или пластиковым стержнем. Не допускается использование тампонов из альгината кальция, а также не рекомендуется использовать ватные палочки с деревянными стержнями. Немедленно поместите тампоны в стерильные пробирки, содержащие 2–3 мл транспортной среды для вирусов или универсальной транспортной среды.

4. Транспортировка образцов

- Упаковку, отгрузку и перевозку образцов необходимо осуществлять в соответствии с действующей редакцией Правил обращения с опасными грузами Международной ассоциации воздушного транспорта (IATA). При отправке потенциальных образцов с 2019-nCoV в испытательную лабораторию соблюдайте правила перевозки биологического вещества UN 3373, Категория В.
- Образцы следует хранить при температуре 2–8 °C и отправлять в испытательную лабораторию на ночь на пакете со льдом. Если образец замораживают при температуре -70°C или ниже, то его следует отправлять в испытательную лабораторию на ночь на сухом льду.

5. Хранение образцов

- Образцы могут храниться при температуре 2–8°C в течение 72 часов после сбора.
- Если ожидается задержка экстрагирования, то образцы следует хранить при температуре -70°C или ниже.
- Экстрагированную нуклеиновую кислоту следует хранить при температуре 4°C, если она будет использоваться в течение 4 часов, или при температуре -70°C и ниже, если она должна храниться более 4 часов.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Наборы для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР

- Хранить при температуре 4°C, при долговременном хранении рекомендуется поддерживать температуру -20°C.
- Разморозку всех компонентов рекомендуется осуществлять на льду в течение 30 минут.
- Тщательно перемешайте компоненты, поместив каждую пробирку в вихревую мешалку, в течение 30 сек, убедившись в их однородности, поскольку при хранении при температуре -20°C может образоваться градиент концентрации.
- Центрифугируйте в течение короткого времени, собрав содержимое на дне каждой пробирки.

Подготовьте аликвоту смеси для проведения необходимого количества реакций (Таблица 7).

Соберите все требуемые компоненты, за исключением образца, диспенсируйте аликвоты в каждую лунку, и в завершение добавьте образец в каждую лунку.

Перед процессом генерации капель реакции должны быть установлены на льду, а фермент RT должен храниться при температуре -20°C все время или на льду в процессе использования.

КОНТРОЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Контрольные образцы, входящие в комплект поставки набора для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от Bio-Rad:

1. Образец «без матрицы» представляет собой (отрицательный) контроль, необходимый для обнаружения загрязнения реагента и/или окружающей среды, в котором вместо клинического образца используется вода, не содержащая РНКазы /ДНКазы, для каждой партии экстрагированных образцов и как минимум в одной лунке на каждом 96-луночном планшете.
2. Контроль с положительной матрицей необходим для обнаружения существенного сбоя процесса обратной транскриптазы и/или проблем с реагентом, включая целостность праймера и зонда. В процессе тестирования будет использоваться стандарт SARS-CoV-2 от компании Exact Diagnostic, при производстве которого использовались синтетические транскрипты РНК, содержащие пять генов-мишеней: гены E, N, ORF1ab, RdRP и S SARS-CoV-2, каждый в количестве 200000 копий/мл на фоне геномной ДНК человека. Материал вводят в матрикс, близкий к образцу, для которого требуется экстракция нуклеиновой кислоты, аналогично клиническому образцу пациента (аликвота 100 мкл на экстракцию). Положительный контроль будет использоваться в концентрации, близкой к пределу детектирования (<5x LoD) теста, и тестироваться как клинический образец. В каждую партию экстрагированных образцов должен быть включен один контроль с положительной матрицей, помещенный как минимум в одну лунку на каждом 96-луночном планшете.
3. Контроль экстракции необходим для обнаружения отказа на этапе экстракции. В процессе тестирования будет использоваться отрицательный образец SARS-CoV-2 от компании Exact Diagnostic, при производстве которого использовались геномные РНК и ДНК человека, введенные в матрикс, близкий к образцу, для которого требуется экстракция нуклеиновой кислоты, аналогично клиническому образцу пациента (аликвота 100 мкл на экстракцию). В каждую партию экстрагированных образцов должен быть включен один контроль экстракции, помещенный как

ЭКСТРАКЦИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Соблюдайте все необходимые правила техники безопасности в соответствии с лабораторными рекомендациями. Также необходимо предпринять меры предосторожности против перекрестного загрязнения образцов. Отдельные рабочие зоны следует использовать для:

- Экстракции нуклеиновых кислот
- Подготовки реагентов (например, подготовка мастермикса для цифровой капельной ПЦР; в данной зоне ЗАПРЕЩАЕТСЯ проводить реакции амплификации, приносить растворы с мишенями или клинические образцы. После завершения работы в данной зоне следует сменить лабораторный халат и перчатки перед тем, как перейти в зону добавления нуклеиновых кислот)
- Добавление нуклеиновой кислоты
- Приборы (например, термоциклеры)

Общие правила обращения

При работе с РНК всегда следует использовать надлежащие микробиологические и асептические методы. Руки и частицы пыли могут переносить бактерии и плесень и являются наиболее частыми источниками загрязнения рибонуклеазой. Всегда надевайте неопудренные латексные, виниловые или нитриловые перчатки при работе с реагентами, пробирками и образцами РНК, чтобы предотвратить загрязнение рибонуклеазой с поверхности кожи или от пыльного лабораторного оборудования.

Часто меняйте перчатки и держите пробирки закрытыми. Во время проведения процедуры работайте быстро и по возможности держите все компоненты на холодных блоках, чтобы избежать деградации РНК вследствие загрязнения эндогенной или остаточной рибонуклеазой. Очищайте рабочие поверхности, пипетки и т.д. 20% хлорной известью или другим раствором, который может разрушить нуклеиновые кислоты и рибонуклеазы. Для предотвращения ускоренного разрушения любых пластиков и металлов протрите их 70% этанолом после использования 20% хлорной извести. Убедитесь, что хлорная известь полностью удалена для предотвращения возможных химических реакций между хлорной известью и тиоцианатом гуанидина, который присутствует в реагентах для экстракции.

Эффективность теста на выявление SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от компании Bio-Rad зависит от количества и качества матричной РНК, очищенной из образцов человека. Следующие коммерческие наборы и процедуры для экстракции были аттестованы и одобрены для выделения и очистки РНК для использования вместе с тестом:

Набор для выделения вирусных/патогенных нуклеиновых кислот ThermoFisher MagMAX (каталожный № A48310, 1000 реакций)

- Добавьте образец пациента в исходный объем 100 мкл и элюируйте с помощью 75 мкл воды, не содержащей РНКазы /ДНКазы в соответствии с инструкциями изготовителя.

Мини набор для выделения вирусной РНК QIAamp (каталожный № 52906, 250 реакций)

- Добавьте образец пациента в исходный объем 140 мкл и элюируйте с помощью 75 мкл буфера AVE или воды, не содержащей РНКазы /ДНКазы в соответствии с инструкциями изготовителя.

Экстрагированную нуклеиновую кислоту следует хранить при температуре 4°C, если она будет использована в течение 4 часов, или при температуре -70°C, при хранении более 4 часов.

В процессе экстракции образца следовать процедурам, рекомендованным изготовителем (за исключением случаев, указанных в рекомендациях выше). Безматричный контроль (NTC) и экстрагированный контроль должны быть включены в каждую партию экстрагированных образцов.

ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ BIO-RAD SARS-CoV-2 ddPCR

Обзор

Тест на выявление SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР предназначен для качественного выявления нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2 в респираторных образцах (мазки из носоглотки, переднего и среднего отдела полости носа, а также носоглоточные смывы/аспира́т и назальные смывы/аспира́ты). Анализ выявляет целевые фрагменты гена нуклеокапсида вируса (N1 и N2) и предназначен для специфического

выявления SARS-CoV-2. Выявление вирусной РНК не только помогает в диагностике заболевания, но также обеспечивает эпидемиологическую информацию и данные мониторингового исследования.

Тест включает в себя три принципиальных этапа: (1) экстракция РНК из образцов пациентов, подготовка реакции ПЦР с обратной транскрипцией и генерация капель, (2) одноступенчатая обратная транскрипция и амплификация ПЦР с использованием праймеров, специфических для SARS-CoV-2, и выявление SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР с использованием зонда Taqman, специфического для SARS-CoV-2, и (3) считывание капель цифровой капельной ПЦР с помощью ридера капель QX200/QXDX.

Описание этапов теста

Нуклеиновые кислоты выделяют из образцов мазков из носоглотки, переднего и среднего отдела полости носа, а также из образцов носоглоточного смыва/асpirата и образцов назального смыва/асpirата и очищают с использованием набора для выделения вирусных/патогенных нуклеиновых кислот ThermoFisher MagMAX или мини набора для выделения вирусной РНК QIAgen QIAamp в соответствии с инструкциями по эксплуатации от изготовителя. Очищенные нуклеиновые кислоты подвергаются обратной транскрипции и амплифицируются с использованием набора для диагностики на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от компании Bio-Rad, который включает три компонента супермикса: Супермикс, обратная транскриптаза и дитиотриитол.

Подготовка мастер-микса для реакции представлена в Таблице 7. Набор для анализа на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР содержит праймеры и зонды для мишеней SARS-CoV-2 N1 и N2, а также праймеры и зонды рибонуклеазы Р человека в одной пробирке, поэтому его можно использовать в качестве теста с одной лункой.

Таблица 7: Подготовка мастер-микса для реакции

Компонент	Объем на реакцию, мкл	Конечная концентрация
Супермикс	5,5	1x
Обратная транскриптаза	2,2	20 U/мкл
300 ммоль ДТТ	1,1	15 ммоль
Наборы для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР (20x)	1,1	1x
Образец РНК	5,5	100 фг-100 нг на реакцию
Вода, не содержащая рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу	6,6	--
Объем на реакцию*	22	

* реакционная смесь содержит 10% запас реакционного объема

Подготовка одноступенчатой реакции ПЦР с обратной транскрипцией

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что рабочие поверхности тщательно очищены смесью хлорной извести (10%) и спирта (70%).

ПРИМЕЧАНИЕ: Не рекомендуется замораживать и размораживать супермиксы повторно. Дитиотриитол следует разделить на аликвоты в нескольких пробирках и поместить на хранение при температуре -20°C для минимизации замерзания и оттаивания.

1. Убедитесь, что извлеченные образцы РНК разморожены.

ПРИМЕЧАНИЕ: Не перемешивайте образцы РНК с использованием вихревой мешалки. Образцы РНК можно перемешивать путем встряхивания пробирок с последующим кратковременным центрифугированием, чтобы собрать материал на дне пробирок.

2. Поместите обратную транскриптазу на лед или холодный блок.

3. Проводите анализ на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР при комнатной температуре.

4. Следующие компоненты должны размораживаться при комнатной температуре в течение мин. 15 мин.

а. Супермикс для одноэтапной ПЦР

б. 300 ммоль дитиотриитола

в. Вода, не содержащая нуклеазы

5. Перемешайте в вихревой мешалке все компоненты (этап 4), а затем проведите центрифугирование в течение короткого времени, чтобы собрать материал на дне пробирок.

6. Поместите компоненты на ледяной или холодный блок.

7. Подготовка мастер-микса для ПЦР с обратной транскрипцией:

а. Подготовьте мастер-микс в соответствии с количеством тестируемых образцов пациентов и контролей (Таблица 8).

центрифугирование в течение короткого времени, чтобы собрать материал на дне пробирок.

ПРИМЕЧАНИЕ: Супермикс для одноступенчатой ПЦР с обратной транскрипцией имеет очень высокую вязкость. Чрезвычайно важно перемешивать его в вихревой мешалке на высокой скорости в течение как минимум 30 секунд после размораживания и перед началом приготовления смеси для анализа. Рекомендуется перемешивать смесь для анализа в вихревой мешалке, поскольку она готовится после каждого добавления реагента. Центрифугируйте в течение короткого времени для осаждения и сбора материала перед добавлением следующего компонента. В завершение перемешайте подготовленную реакционную смесь в вихревой мешалке в течение 30 секунд на высокой скорости перед нанесением ее на планшет.

Таблица 8: Объемы компонентов мастер-микса для цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией по количеству образцов пациентов

Компонент	Кол-во образцов*(образцы + допустимый избыток), объем в мкл				
	1х	(16+2)х	(32+3)х	(48+4)х	(96+6)х
Супермикс	5,5	99	192,5	286	561
Обратная транскриптаза	2,2	39,6	77	114,4	224,4
300 ммоль дитиотриитола	1,1	19,8	38,5	57,2	112,2
Набор для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР	1,1	19,8	38,5	57,2	112,2
Вода, не содержащая нуклеазы	2,2	39,6	77	114,4	224,4
Итого	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1

8. Внесите 12,1 мкл мастер-смеси в соответствующие лунки планшета цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией. Добавьте 9,9 мкл экстрадированного образца РНК в соответствии с предлагаемой схемой планшета (Рисунок 2).

9. Добавьте 9,9 мкл стандарта от компании ExactDx и отрицательного образца от компании ExactDx (Рисунок 2).

ПРИМЕЧАНИЕ: При загрузке планшет цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией можно поместить на ледяной блок.

ПРИМЕЧАНИЕ: Недопустимо, чтобы планшеты RT-ddPCR содержали неполные колонки. Если какие-либо колонки используются частично, выполните шаг 10.

Если все восемь лунок в колонке не используются для контрольных образцов или образцов, в неиспользуемые лунки необходимо добавить буферный контроль для цифровой капельной ПЦР (контрольный буфер ddPCR™ для зондов, разведенный водой 1: 1). Для автоматизированного генератора капель требуется, чтобы все лунки в колонке были заполнены раствором для реакции ПЦР или буфером. Капли не будут формироваться, если какие-либо лунки в колонке останутся пустыми..

Рисунок 2. Схема планшета для цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A NTC	PTSample6	PTSample14	PTSample22	PTSample30	PTSample38	PTSample46	PTSample54	PTSample62	PTSample70	PTSample78	PTSample86	
B ExactDxNegExtCtrl	PTSample7	PTSample15	PTSample23	PTSample31	PTSample39	PTSample47	PTSample55	PTSample63	PTSample71	PTSample79	PTSample87	
C ExactDxPosExtCtrl	PTSample8	PTSample16	PTSample24	PTSample32	PTSample40	PTSample48	PTSample56	PTSample64	PTSample72	PTSample80	PTSample88	
D PISample1	PTSample9	PTSample17	PTSample25	PTSample33	PTSample41	PTSample49	PTSample57	PTSample65	PTSample73	PTSample81	PTSample89	
E PISample2	PTSample10	PTSample18	PTSample26	PTSample34	PTSample42	PTSample50	PTSample58	PTSample66	PTSample74	PTSample82	PTSample90	
F PISample3	PTSample11	PTSample19	PTSample27	PTSample35	PTSample43	PTSample51	PTSample59	PTSample67	PTSample75	PTSample83	PTSample91	
G PISample4	PTSample12	PTSample20	PTSample28	PTSample36	PTSample44	PTSample52	PTSample60	PTSample68	PTSample76	PTSample84	PTSample92	
H PISample5	PTSample13	PTSample21	PTSample29	PTSample37	PTSample45	PTSample53	PTSample61	PTSample69	PTSample77	PTSample85	PTSample93	

10. После добавления нуклеиновой кислоты на планшет для мастер-микса, накройте планшет запаяивательной пленкой из фольги с помощью запаявателя планшетов PX1.

- Установите запаяватель для планшетов PX1 на 180°C на 5 секунд (установки не по умолчанию)
- Храните алюминиевый блок при комнатной температуре, если запаяватель не используется.
- Поместите планшет для цифровой капельной ПЦР на блок при комнатной температуре

- d. Накройте планшет листом запаивательной пленки, прокалываемой без разрывов. Должна быть видна красная полоса.

ПРИМЕЧАНИЕ: Не используйте металлическую рамку.

- e. Чтобы запечатать планшет, нажмите кнопку Seal (Запаять) (закроется дверца и начнется запаивание).
- f. Выньте планшет и алюминиевый блок из запаивателя планшетов PX-1.
- g. Убедитесь, что все лунки на планшете запечатаны, ; на пленке должны быть видны следы каждой лунки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подробные инструкции см. в Руководстве по эксплуатации запаивателя планшетов PX1.

ПРИМЕЧАНИЕ: Снимите алюминиевый блок с запаивателя планшетов PX1, если он не используется, во избежание перегрева блока.

11. Перемешивайте планшет в течение 30 секунд на высокой скорости.
12. Центрифугируйте планшет для цифровой капельной ПЦР в течение 30 секунд с ускорением 1000 g, чтобы удалить любые пузырьки воздуха и позволить реакционной смеси для цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией скапливаться на дне лунок. Если пузырьки остаются, повторите центрифугирование.
13. Выполните генерацию капель.

Генерация капель

ПРИМЕЧАНИЕ: Инструкции, включенные в этот раздел, распространяются на системы капельной цифровой ПЦР QX200 и QXDx AutoDG.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что рабочие поверхности и поверхности приборов тщательно очищены смесью хлорной извести (10%) и спирта (70%).

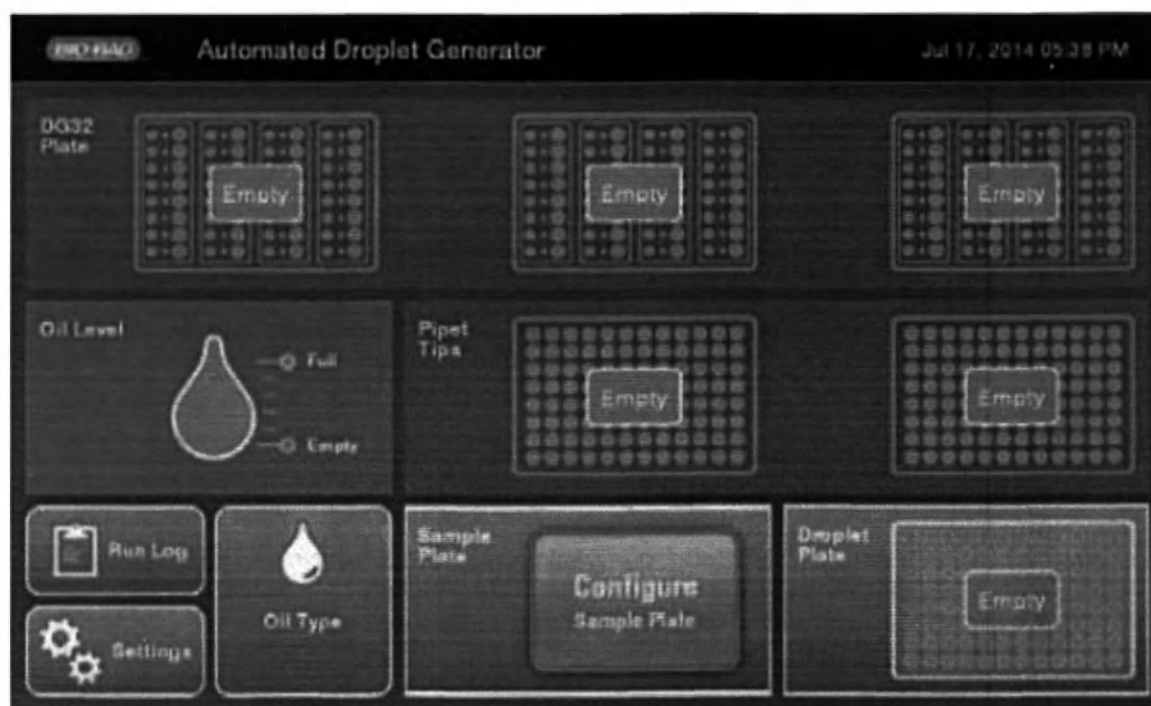
ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что контейнер для отходов пуст и установлен в соответствующем положении на системе AutoDG.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом генерации капель убедитесь, что охлаждающий блок помещен на хранение в перевернутом виде при температуре -20°C как минимум на 2 часа.

ПРИМЕЧАНИЕ: Периодически проверяйте охлаждающий блок, чтобы убедиться, что запаивательная пленка из фольги не повреждена.

1. Соберите все расходные материалы, необходимые для постановки на автоматизированном генераторе капель QX200 или QXDx.
 - a. Картриджи DG32
 - б. Наконечник пипетки для системы AutoDG (стойки)
 - в. Масло для зондов системы AutoDG
 - г. Планшет с образцами (планшет для цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией со смесями для реакций)
 - д. Планшет для капель (новый планшет для цифровой капельной ПЦР, в который будут внесены сгенерированные капли)
2. Откройте дверцу AutoDG и загрузите планшет с образцами в автоматизированный генератор капель в положении «Планшет с образцами». Должен загореться зеленый индикатор (Рисунок 3).

Рисунок 3. Интерфейс пользователя автоматизированной системы генерации капель



3. Нажмите на кнопку **Configure Sample Plate** (Настроить планшет с образцами) на интерфейсе AutoDG, выберите колонки, куда помещены образцы, и нажмите «ОК». Можно ввести название планшета и примечания, но это не обязательно (Рисунок 4).

ПРИМЕЧАНИЕ: Лунки можно выбрать только в колонках 8 на экране настройки AutoDG (Рисунок 4).

Рисунок 4. Конфигурация планшета с образцами на интерфейсе AutoDG

А. Выбрано 12 колонок (96 лунок, 93 образца, 3 контрольных образца)	В. Выбрано 6 колонок (48 лунок, 45 образцов, 3 контрольных образца)

4. В зависимости от количества колонок, выбранных на планшете с образцами, загораются желтые индикаторы, которые указывают расходные материалы, которые необходимо загрузить в прибор.
5. Выньте охлаждающий блок из морозильной камеры (-20°C) и поместите его в место на планшете для капель в Автоматизированном генераторе капель (Рисунок 3). Должен загореться зеленый индикатор.
6. Загружайте необходимые расходные материалы, пока соответствующие световые индикаторы не загорятся зеленым светом.
 - а. Загрузите пустой 96-луночный планшет ddPCR на охлаждающий блок на место, предназначенное для планшета для капель.
 - б. Установите бутылку с маслом для зондов системы AutoDG с левой стороны прибора и зафиксируйте в держателе, повернув бутылку. Выберите Probes (Зонды) в области Oil Type (Тип масла) пользовательского интерфейса AutoDG и нажмите ОК. Значок уровня масла на экране

выделится синим цветом, и на дисплее отобразится фактический уровень масла в бутылки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Этот шаг необходимо выполнить только в том случае, если уровень масла недостаточен для рабочего цикла.

- c. Загрузите наконечники пипеток AutoDG вдоль центрального ряда прибора, сняв пластиковую пленку и крышку коробки.

ПРИМЕЧАНИЕ: В систему следует загружать только полные коробки с наконечниками.

- d. Загрузите картриджи DG32 (зелеными прокладками справа) вдоль заднего ряда прибора в держатели планшетов. Держатели снабжены приспособлениями для правильной ориентации, и при правильном размещении индикатор станет зеленым.

7. После того как все светодиодные индикаторы системы AutoDG загорятся зеленым цветом, нажмите синюю кнопку Start Droplet Generation (Начать генерацию капель).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Держитесь от прибора на расстоянии, дверца закрывается автоматически перед началом рабочего цикла.

8. Пользовательский интерфейс AutoDG запросит у пользователя подтверждение запуска генерации капель после нажатия на кнопку Start Run (Запустить выполнение).

ПРИМЕЧАНИЕ: На экране будет отображаться время, оставшееся до окончания генерации капель. Если образование капель по какой-либо причине прекращается, на экране AutoDG появляется сообщение «Цикл завершен». Если цикл прекращается, определите причину сбоя и следуйте инструкциям в разделе поиска и устранения неисправностей в Инструкции по эксплуатации Системы капельной цифровой ПЦР QX200 или QXDx AutoDG.

9. После успешного завершения генерации капель снимите планшет для капель, запечатайте его запаивательной пленкой из фольги и запустите ПЦР.

ПРИМЕЧАНИЕ: Амплификация должна начаться в течение 30 минут после завершения цикла образования капель с помощью системы AutoDG.

10. Запечатайте планшет фольгой, используя запаиватель для планшетов PX1.

- a. Установите запаиватель для планшетов PX1 на 180°C на 5 секунд (настройки не по умолчанию).

- b. Храните алюминиевый блок при комнатной температуре, если запаиватель не используется.

- c. Поместите планшет для цифровой капельной ПЦР на блок при комнатной температуре.

- d. Накройте планшет листом запаивательной пленки, прокалываемой без разрывов. Должна быть видна красная полоса.

ПРИМЕЧАНИЕ: Не используйте металлический каркас.

- e. Чтобы запечатать планшет, нажмите кнопку Seal (Запаять) (закроется дверца и начнется запаивание).

- f. Выньте планшет и алюминиевый блок с запаивателя планшетов PX-1.

- g. Убедитесь, что все лунки планшета заклеены; на пленке должны быть видны следы каждой лунки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подробные инструкции см. в Руководстве по эксплуатации запаивателя планшетов PX1.

ПРИМЕЧАНИЕ: Снимите алюминиевый блок с запаивателя планшетов PX1, если он не используется во избежание перегрева блока.

11. Планшет для капель теперь готов к реакции одноступенчатой ПЦР с обратной транскрипцией

12. Немедленно переходите к настройке процесса цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией или поместите планшет для капель на хранение при 4°C до 24 часов.

Термоциклер C1000 Touch или S1000 с реакционным модулем на 96 глубоких лунок для цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией

1. Поместите в термоциклер запечатанный планшет с каплями для амплификации и запустите протокол термоциклирования для теста SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР (Таблица 9).

Таблица 9. Протокол термоциклирования для теста SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР

Этап циклирования	Температура (°C)	Время	Кол-во циклов
Обратная	50	60 мин	1

транскриптаза			
Активация ферментов	95	10 мин	1
Денатурация	94	30 с	40
Нагревание/элонгация	55	60 с	
Деактивация ферментов	98	10 мин	1
Стабилизация капель	4	30 мин	1
Удержание (опционально)	4	24 ч	1

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Скорость линейного изменения должна быть обязательно установлена на 2°C/с, поскольку значения по умолчанию отличаются для разных термоциклеров.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании термоциклеров C1000 Touch или S1000 с реакционным модулем на 96 глубоких лунок установите объем образца 40 мкл и температуру крышки на 105°C. Дополнительную информацию можно найти в руководстве по эксплуатации термоциклера C1000 Touch или S1000 с реакционным модулем на 96 глубоких лунок.

Считывание капель, сбор и анализ данных

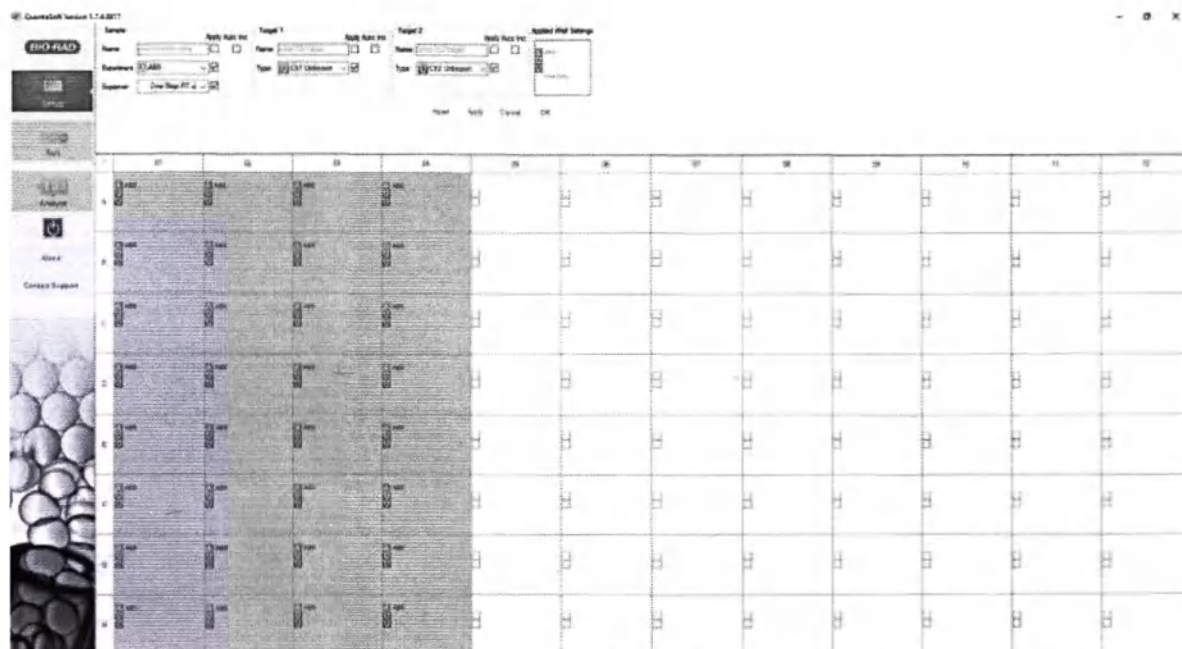
Настройка протокола анализа с помощью программного обеспечения QuantaSoft

- После завершения термоциклирования перенесите запечатанный планшет с каплями в Ридер капель QX200, IVD, Ридер капель QX200 или Ридер капель QXDx.
- На компьютере, подключенном к Ридеру капель, откройте ПО QuantaSoft в режиме настроек и Select New Run (Выбрать новый цикл) > Select Test Name (Выбрать название испытания) > Select New Plate (Выбрать новый планшет).

ПРИМЕЧАНИЕ: Инструкции, включенные в этот раздел, распространяются на Системы капельной цифровой ПЦР QX200 и на QXDx AutoDG.

- Дважды щелкните по лунке планшета на схеме планшета, чтобы открыть диалоговое окно Well Editor (Редактор лунок). Выберите лунки, подходящие для цикла, и выберите следующее (Рисунок 5):
 - Experiment (Эксперимент): ABS
 - Supermix (Супермикс): One-Step RT-ddPCR Kit for Probes (Набор для проведения одноступенчатой ПЦР с обратной транскрипцией для зондов)
 - Target 1 Type (Тип мишени 1): Ch1 Unknown (Канал 1 Неизвестный)
 - Target 2 Type (Тип мишени 2): Ch2 Unknown (Канал 2 Неизвестный)
- Присвойте названия образцов лункам в соответствии со схемой планшета.

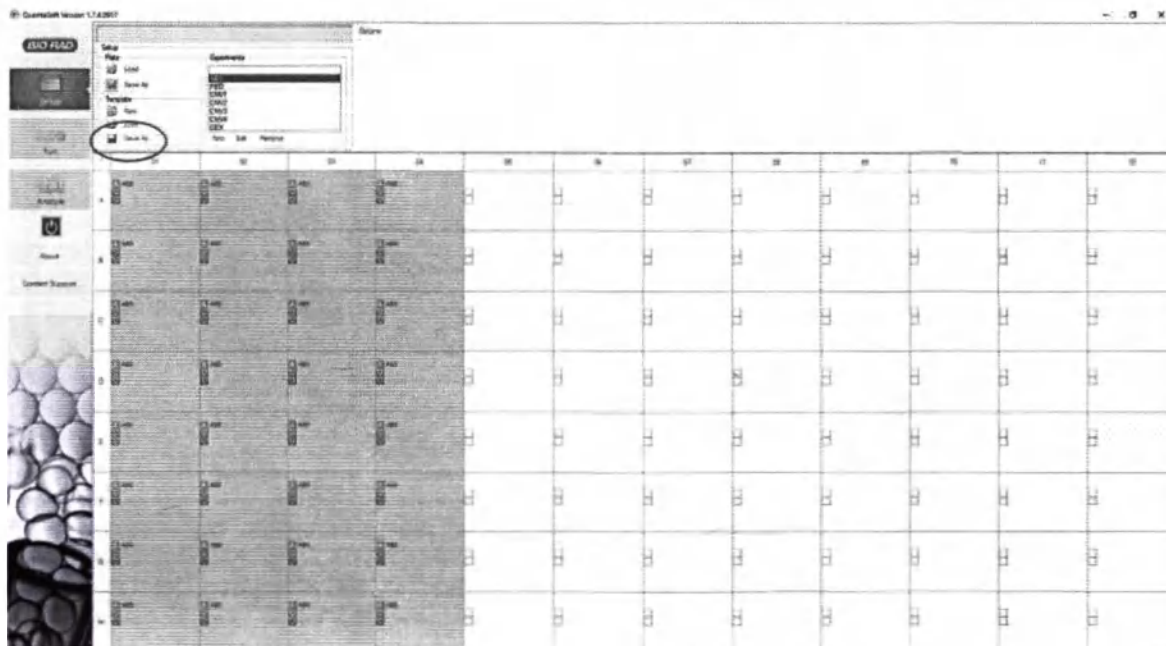
Рисунок 5. Настройка QuantaSoft: Диалоговое окно Well Editor (Редактор лунок)



4. Для каждой лунки в планшете введите идентификатор образца и выберите **Apply** (Применить).
5. Выберите Тип образца для каждой лунки.
 - а. Для лунок, которые содержат буфер, а не образец, выберите **Buffer** (Буфер) и нажмите **Apply**.
6. Завершив обозначение лунок и настройку планшета, нажмите **OK**.
7. Сохраните наименование планшета, нажав на **Save As** (Сохранить как) под заголовком «Шаблон» в Настройках (Рисунок 6).
8. Загрузите (**Prime**) Ридер капель, нажав кнопку в правом верхнем углу окна режима настройки. Рекомендуется загружать прибор каждый день перед первым запуском.
9. Нажмите на кнопку **Run** (Запуск) на левой панели и начните процесс считывания капель.
10. В правой части экрана на индикаторах состояния прибора должны отображаться зеленые галочки механической проверки системы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Если какой-либо из индикаторов состояния прибора не горит зеленым светом, следуйте инструкциям о состоянии на наклейке инструмента.
11. Во время сбора данных ПО будет отображать информацию о предварительном качестве полученных данных и ожидаемом времени до завершения.

Рисунок 6. Настройка QuantaSoft: Сохранение выполненного шаблона

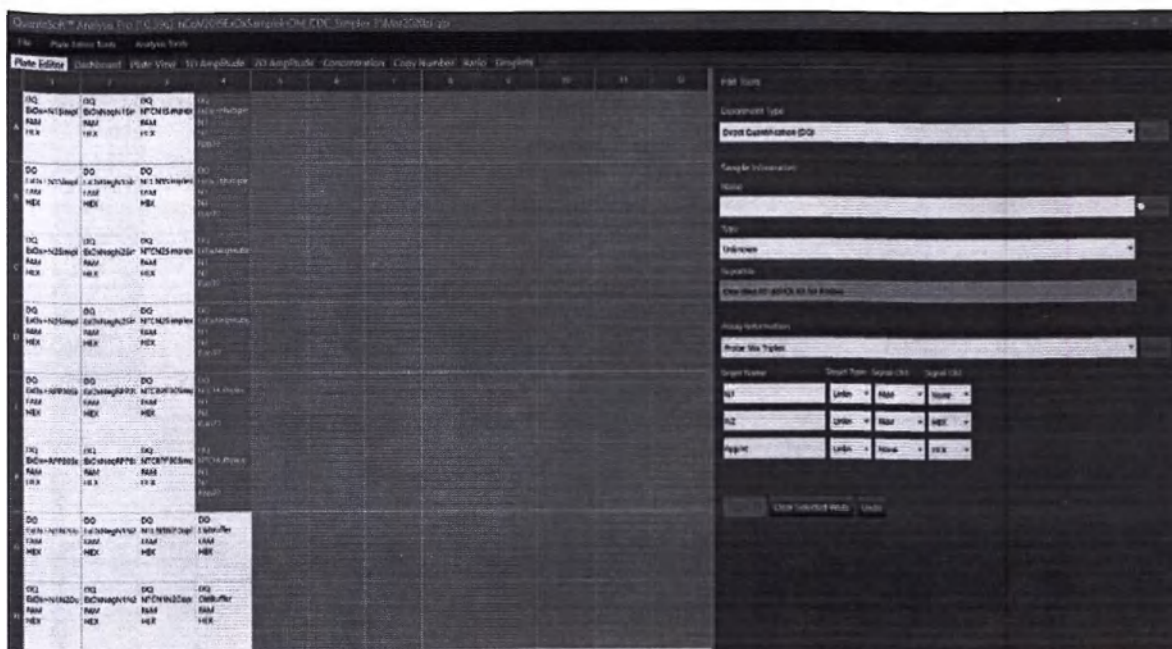


Анализ данных с использованием QuantaSoft Analysis Pro

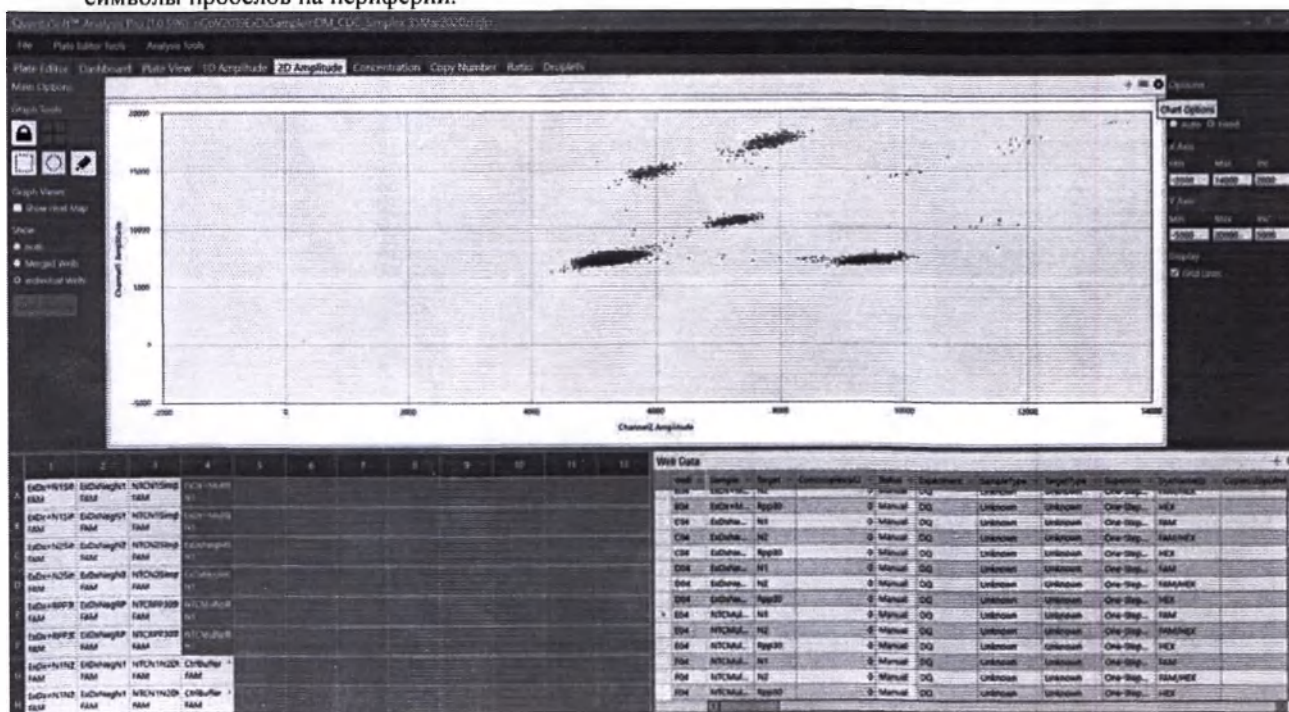
1. ПО QuantaSoft Analysis Pro (AP) доступно для загрузки и установки по адресу <http://www.bio-rad.com/en-us/product/qx200-droplet-digital-pcr-system>. Нажмите на вкладку Download «Скачать». Перед установкой ознакомьтесь с минимальными системными требованиями.
2. ПО QuantaSoft Analysis Pro (AP) открывает и анализирует файлы, созданные в QuantaSoft Software 1.4 и в более поздних версиях. Это ПО предназначено только для анализа; его нельзя использовать для запуска Ридера каплей QX200 или QXDx.
3. После того, как считывание капли завершено, щелкните правой кнопкой мыши на файл для анализа и выберите **Open with** (Открыть с помощью). Выберите **QuantaSoftAnalysisPro**. Или откройте QSAP двойным щелчком по ярлыку на рабочем столе или в меню «Пуск», затем перетащите файлы .qlp для анализа в окно Analysis Pro.
4. На вкладке **Plate Editor** (Редактор планшетов) выберите все лунки для анализа. С помощью **Experiment Type** (Тип эксперимента) в качестве **Direct Quantification (DQ)** (Прямое количественное определение); выберите **Probe MixTriplex** в разделе **Assay Information** (Информация об анализе) и нажмите **Apply**. Введите информацию о мишени (Таблица 10) и нажмите **Apply**.

Таблица 10. Информация о мишени в QuantaSoft Analysis Pro

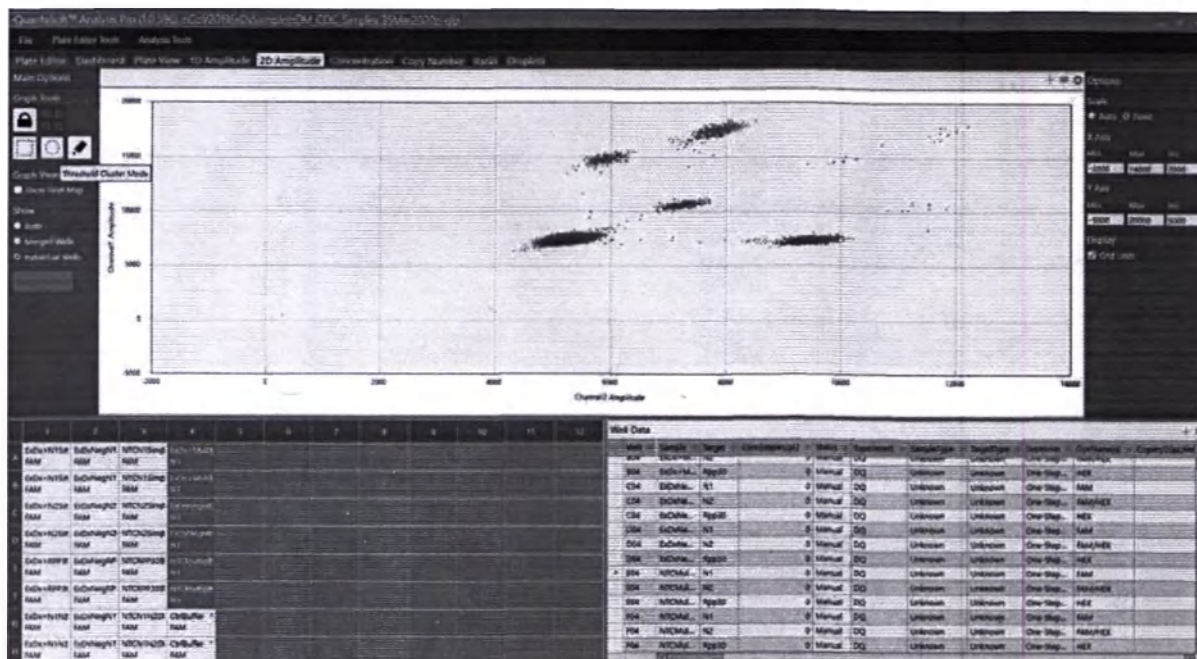
Название мишени	Сигнальный канал 1	Сигнальный канал 2
N1	FAM	—
N2	FAM	HEX
RP	—	HEX



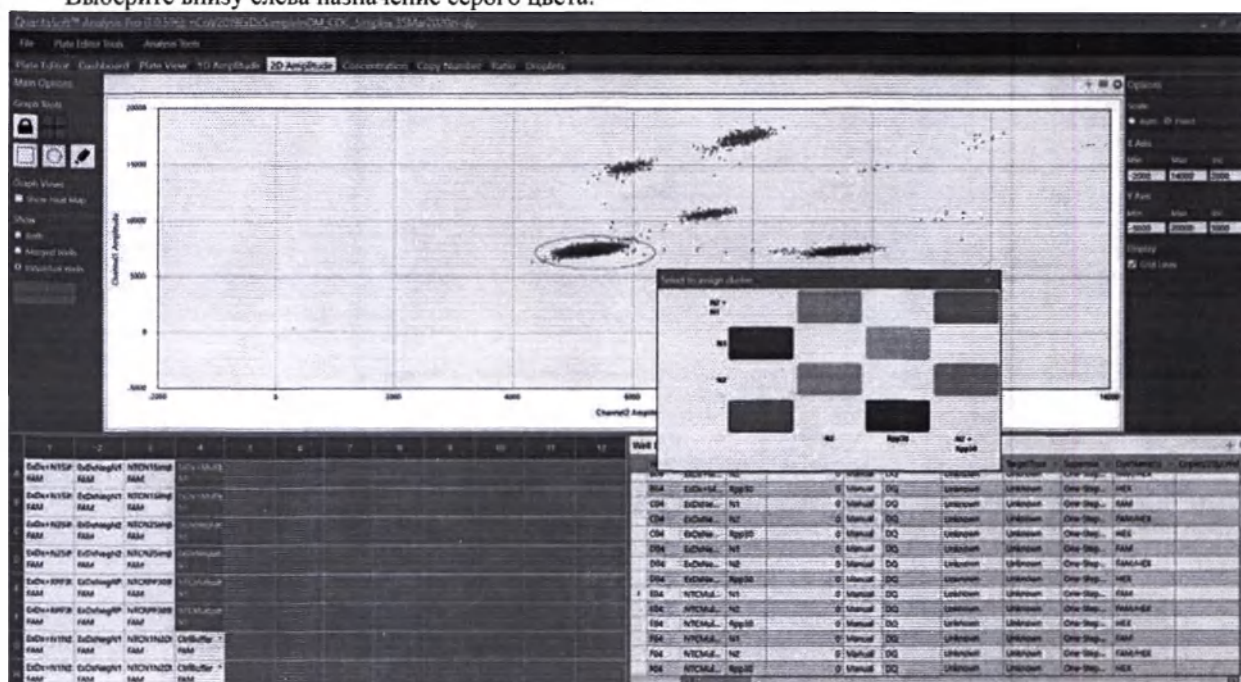
5. Во вкладке 2D Amplitude выберите все лунки для анализа. Щелкните на маленькую иконку с шестеренкой справа от 2D-графика под **Options** (Опции) и выберите **Fixed** (Зафиксировано). Минимальные и максимальные значения осей 2D-графика можно откорректировать, чтобы убрать символы пробелов на периферии.



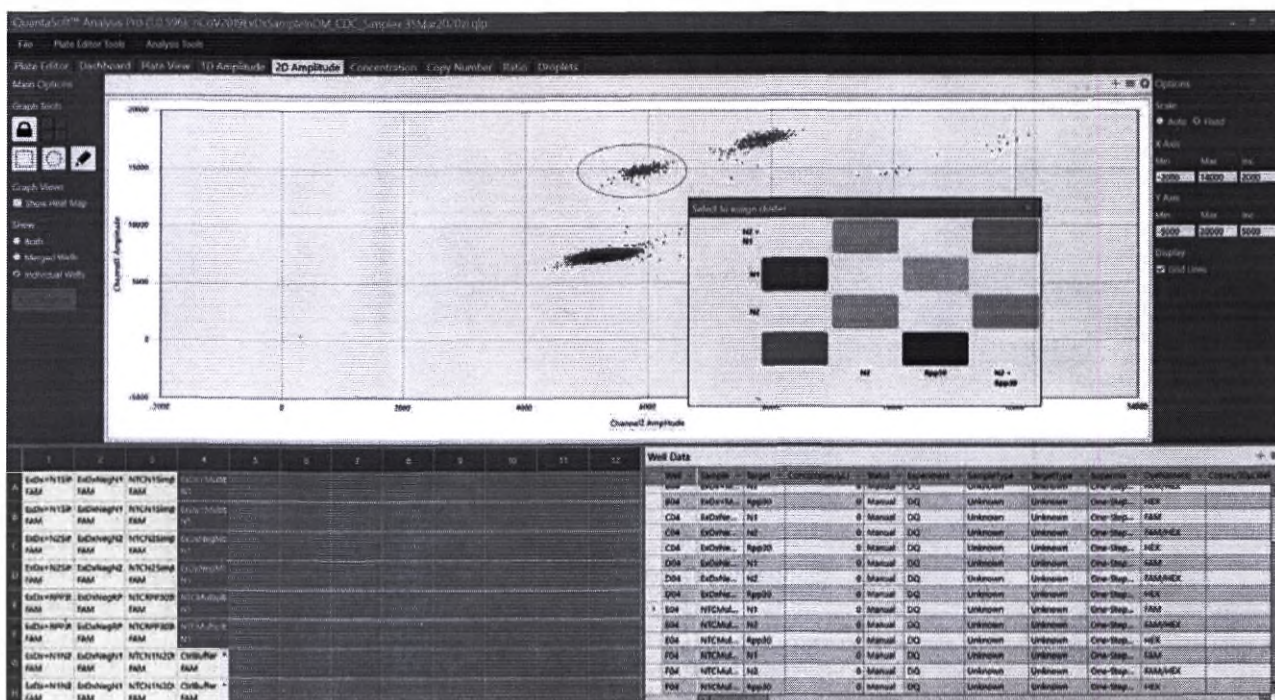
6. В **GraphTools** (Графические инструменты) слева от 2-мерного графика выберите один из **Threshold Cluster Modes** (Режимы кластера пороговых величин). Режим предпочтения можно выбрать, исходя из пользовательских предпочтений; инструмент для обводки кругом может быть очень удобен для пользователя. Удерживайте **Graph View** (Графическая область обзора) в **Individual Wells** (Отдельные лунки).



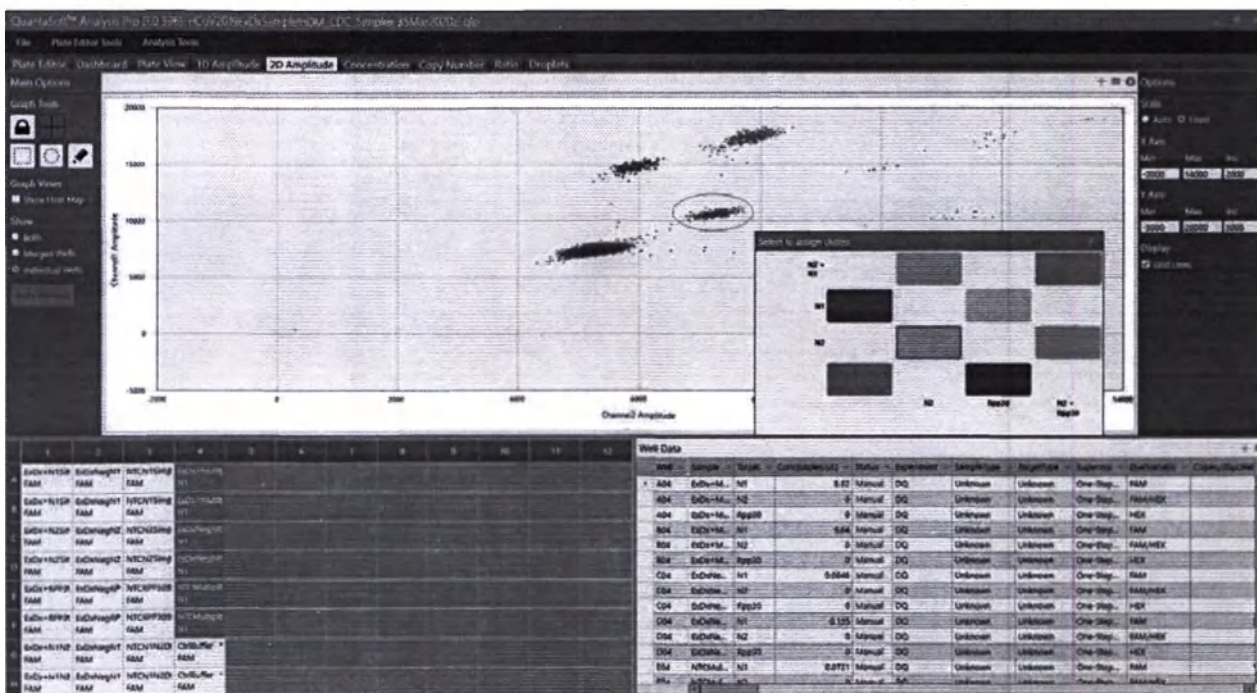
7. Используя курсор мыши, выберите нижний левый (трижды отрицательный) кластер. Появится окно **Select to assign cluster** (Выбор для назначения кластера). Выберите внизу слева назначение серого цвета.



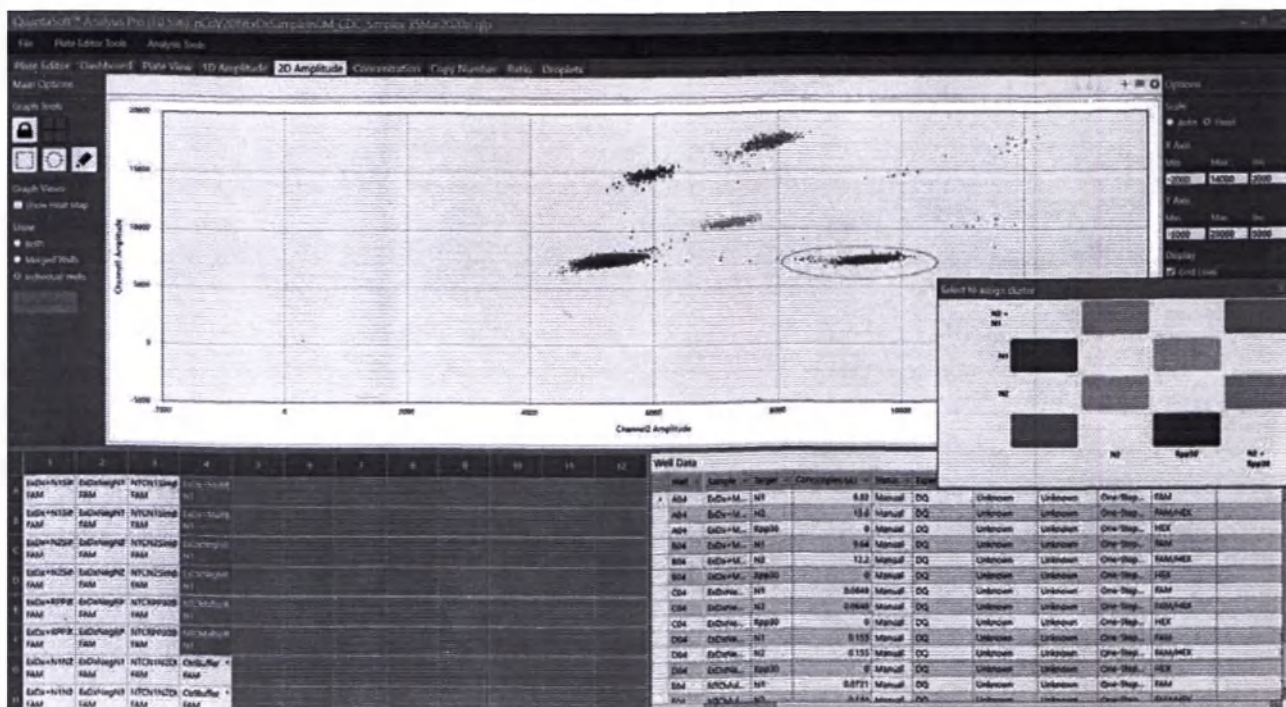
8. Снова обведите кружком и присвойте описание кластеров всем кластерам.
9. Кластер, который непосредственно расположен над трижды отрицательным, соответствует N1 (однократно положительный, канал FAM).



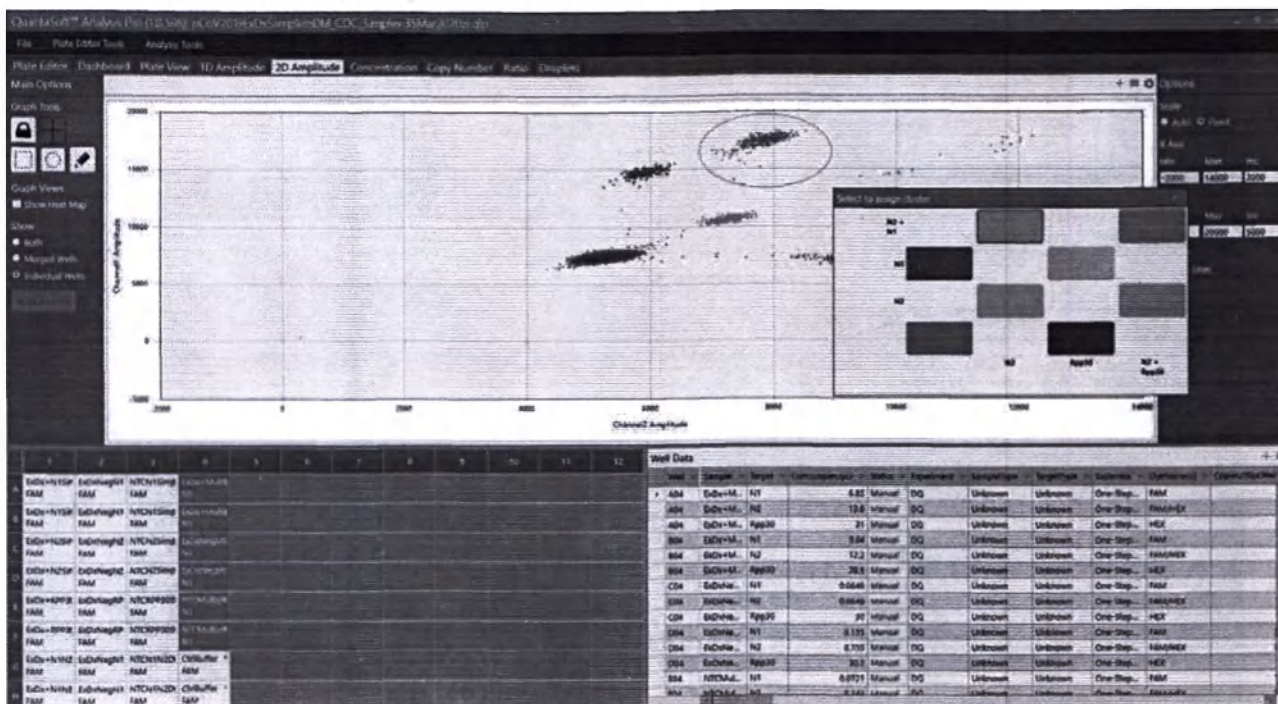
10. Кластер под углом 45° от трижды отрицательного соответствует N2 (однократно положительный; каналы FAM и HEX).



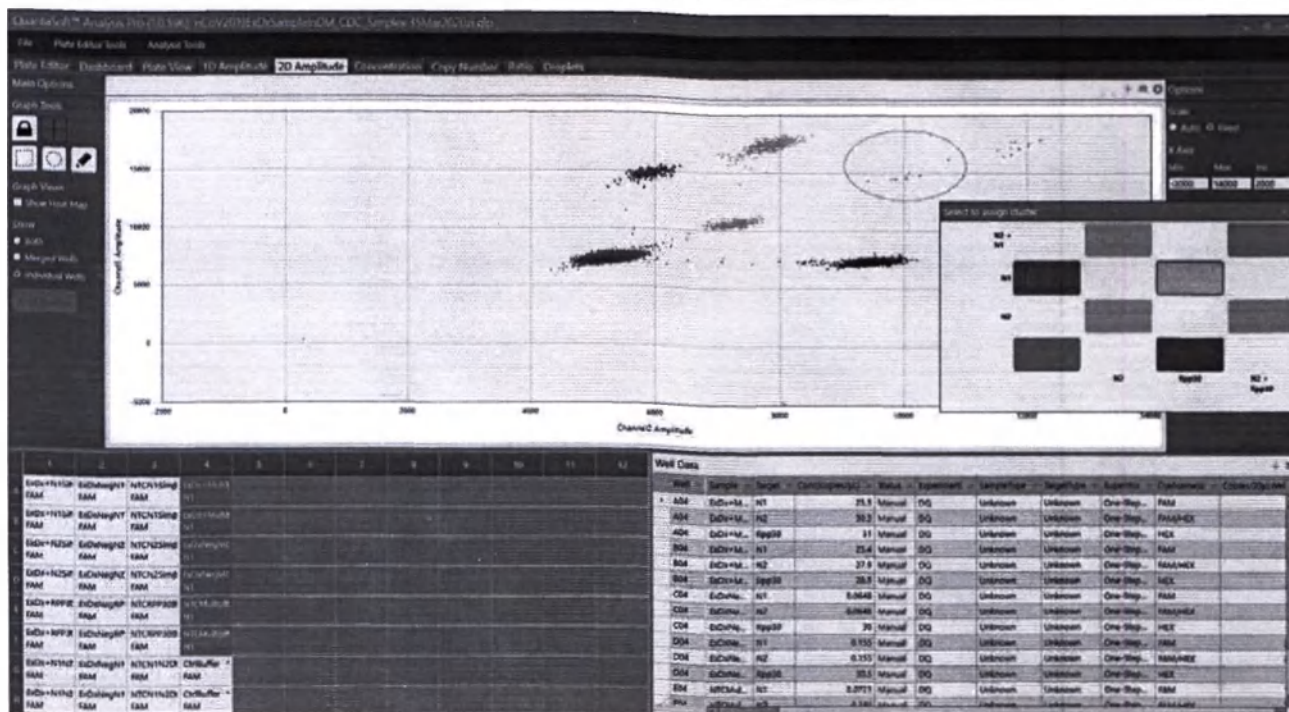
11. Кластер непосредственно справа от трижды отрицательного кластера соответствует **RP** (однократно положительный, канал HEX).



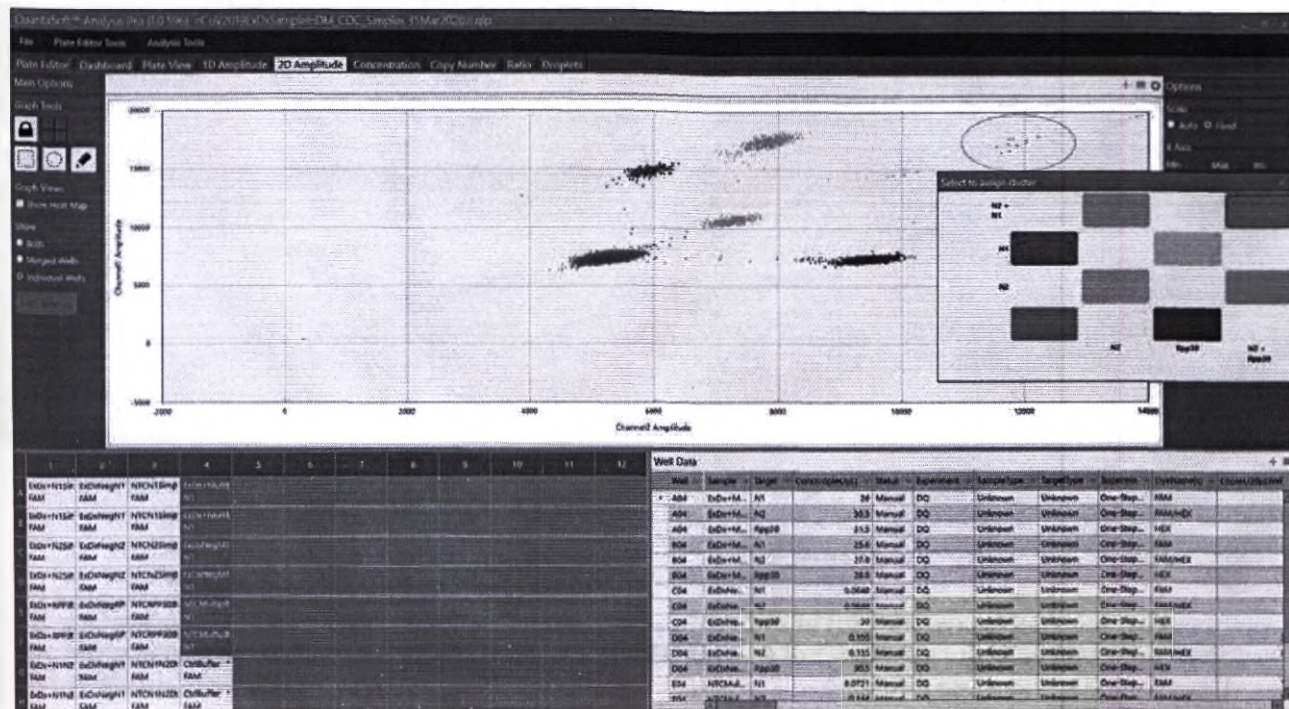
12. Над однократно положительными кластерами N1 и N2 расположен дважды положительный кластер, соответствующий каплям, обе N1 и N2-положительные.



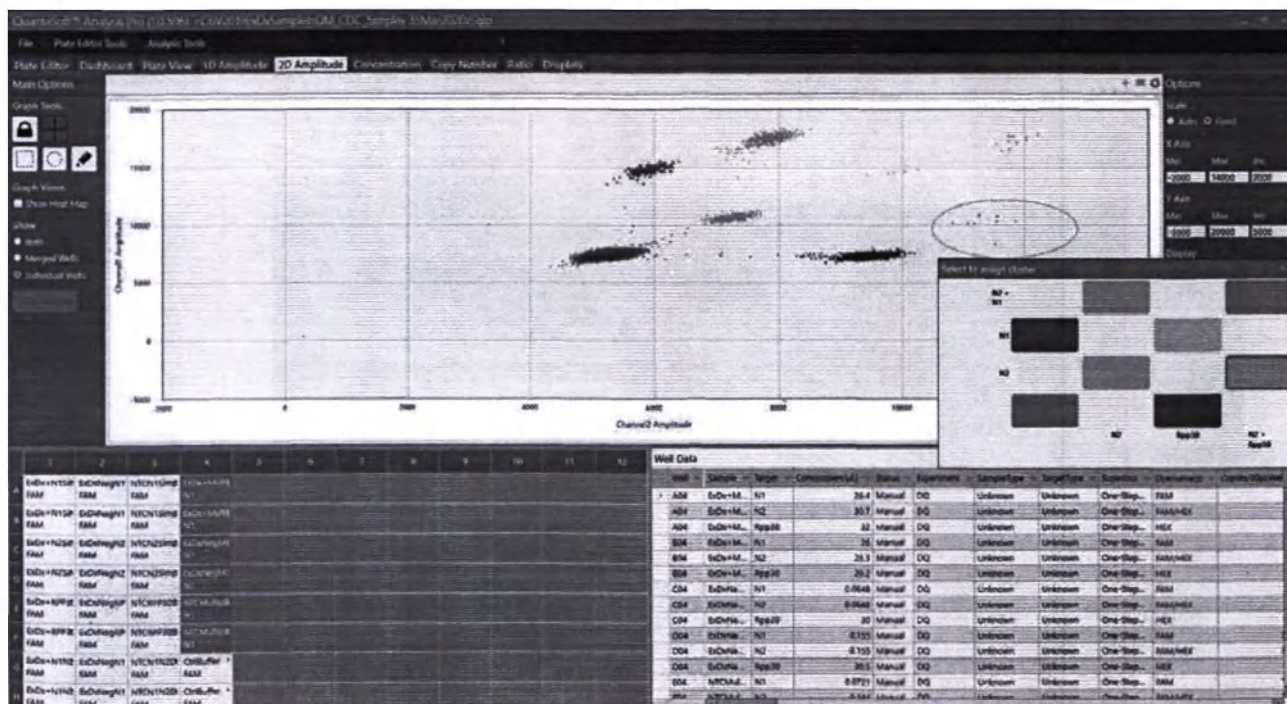
13. Над однократно положительным кластером RP расположен дважды положительный кластер, соответствующий каплям, обе N1 и RP-положительные.



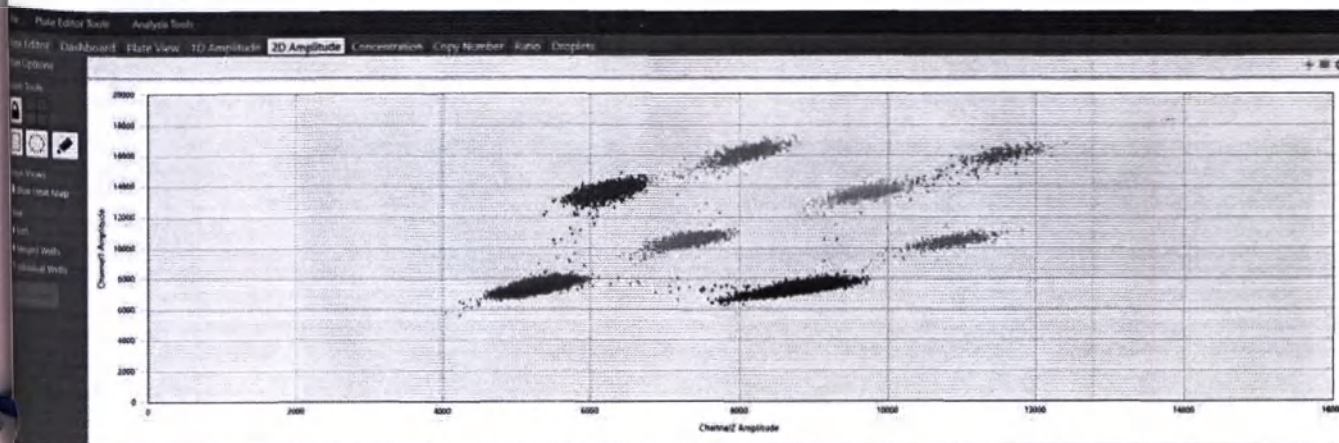
14. Справа от дважды положительного кластера N1 и N2 находится трижды положительный кластер N1, N2 и RP, соответствующий каплям, которые являются положительными для всех трех мишеней.



15. Ниже трижды положительного кластера находится дважды положительный кластер N2 и RP, соответствующий каплям, обе N2 и RP положительные.



16. После выбора примените назначения кластера. Окончательная конфигурация выглядит как на рисунке ниже.



ПРИМЕЧАНИЕ: Применив назначение кластера для всего планшета, важно выбрать каждую лунку и проверить соответствующие кластеры. Используйте кружок в Режиме кластера пороговых величин для переназначения плотно расположенных кластеров для каждой лунки и для проверки неточной разбивки на кластеры или кластеров, которые не были полностью выбраны.

17. Количественные определения представлены в окне **Well Data** (Данные лунки) в правом нижнем углу. Используйте значок в виде трех колонок в правом верхнем углу таблицы «Данные лунки для экспорта данных в Excel/CSV».

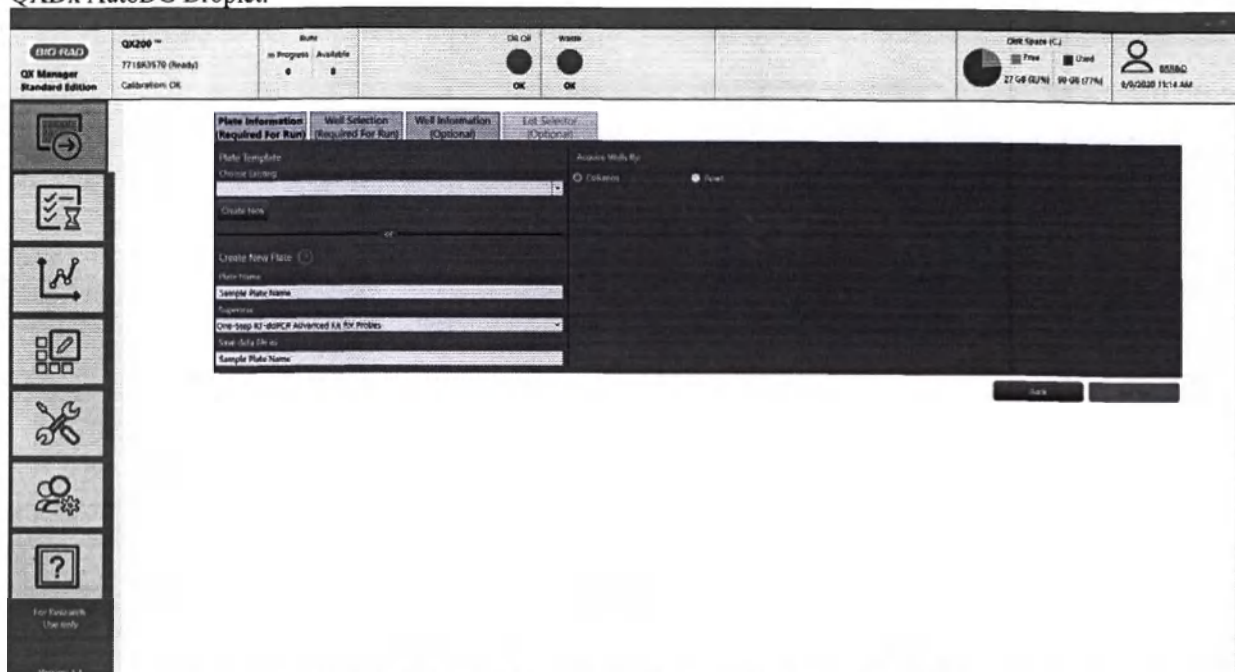
18. Концентрация указана в копиях/мкл конечной 1X реакции ddPCR для каждой из мишеней (N1, N2 и RP).

Чтение капель, сбор и анализ данных с помощью QX Manager

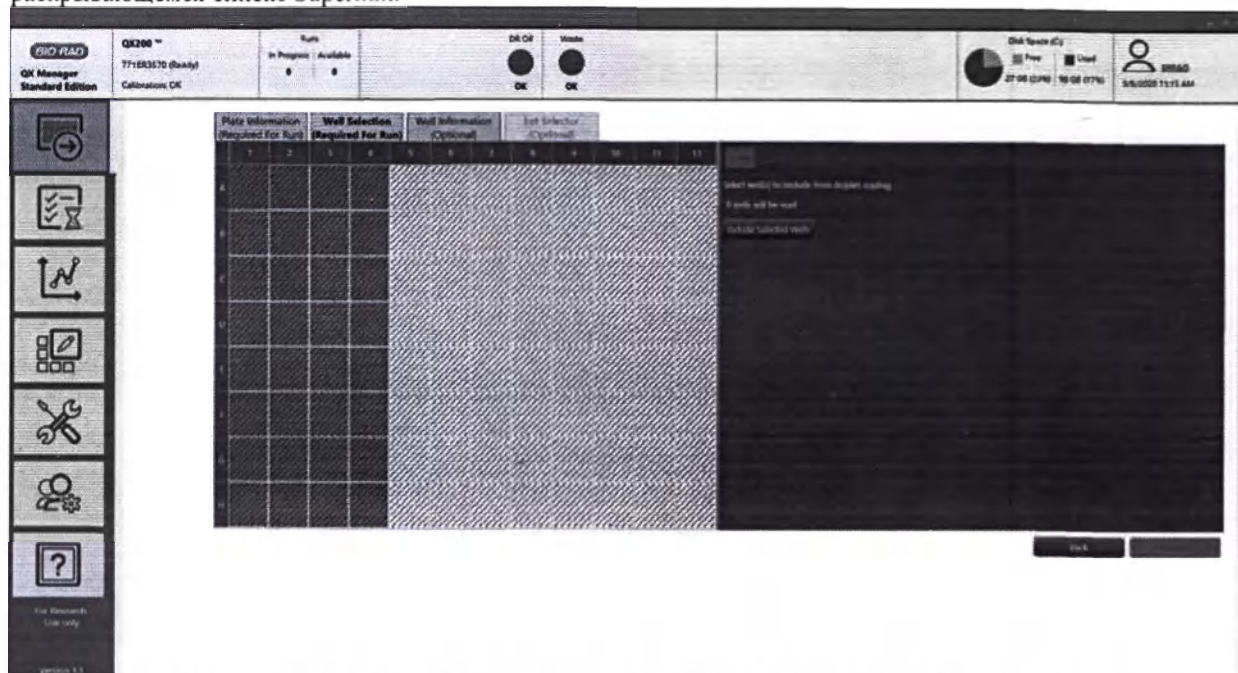
Настройка и запуск программного обеспечения QX Manager

1. Программное обеспечение QX Manager доступно для загрузки и установки по адресу <https://www.bio-rad.com/en-us/product/qx-software?ID=Q1073URA83CC>. Щелкните по вкладке Download. Перед установкой ознакомьтесь с минимальными системными требованиями.
2. С помощью этого программного обеспечения можно выполнять как запуск Droplet Reader, так и анализ данных.
3. После завершения термоциклирования перенесите планшет для капель в устройство для чтения капель QX200, IVD, QX200 Droplet Reader или QXDx Droplet Reader.
4. На компьютере, подключенном к Droplet Reader, откройте QX Manager. и перейдите на вкладку «Добавить планшет», затем нажмите «Добавить планшет» > «Настроить планшет», чтобы открыть страницу настройки планшета.

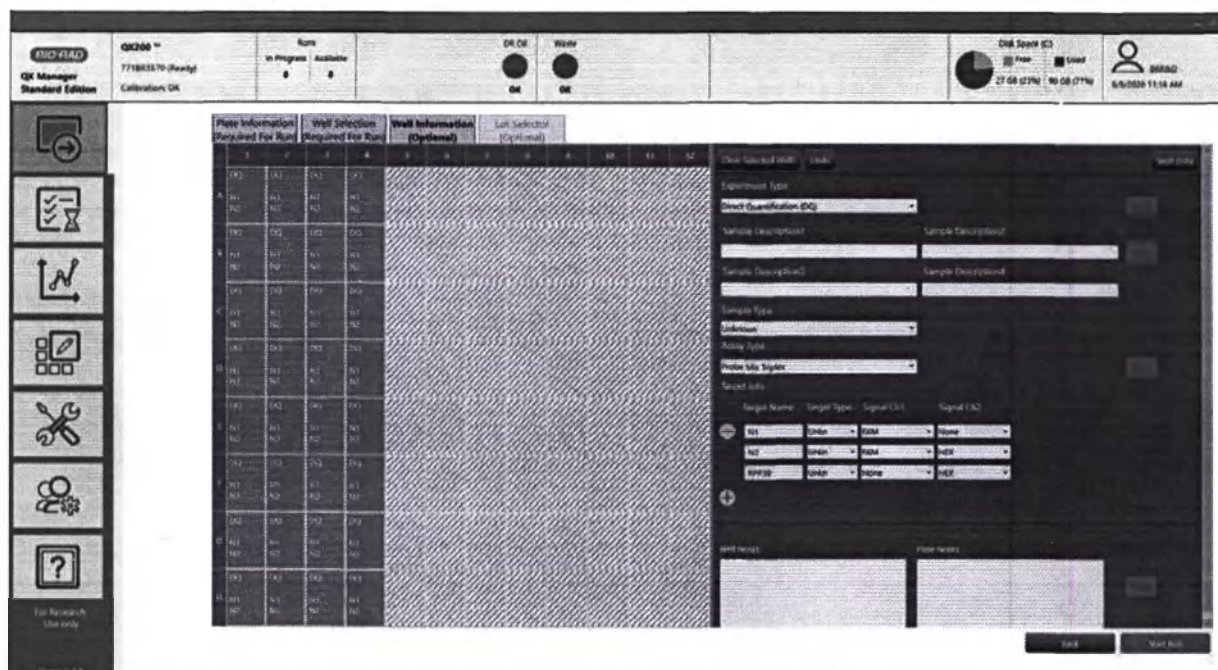
Примечание. Инструкции, включенные в этот раздел, применимы как к системам цифровой ПЦР QX200, так и к QXDx AutoDG Droplet.



5. Добавьте название планшета и выберите «Расширенный набор One-Step-RT-ddPCR для датчиков» в раскрывающемся списке Supermix.



6. На вкладке «Выбор лунок» выберите лунки, подходящие для цикла, и нажмите «Включить выбранные лунки».



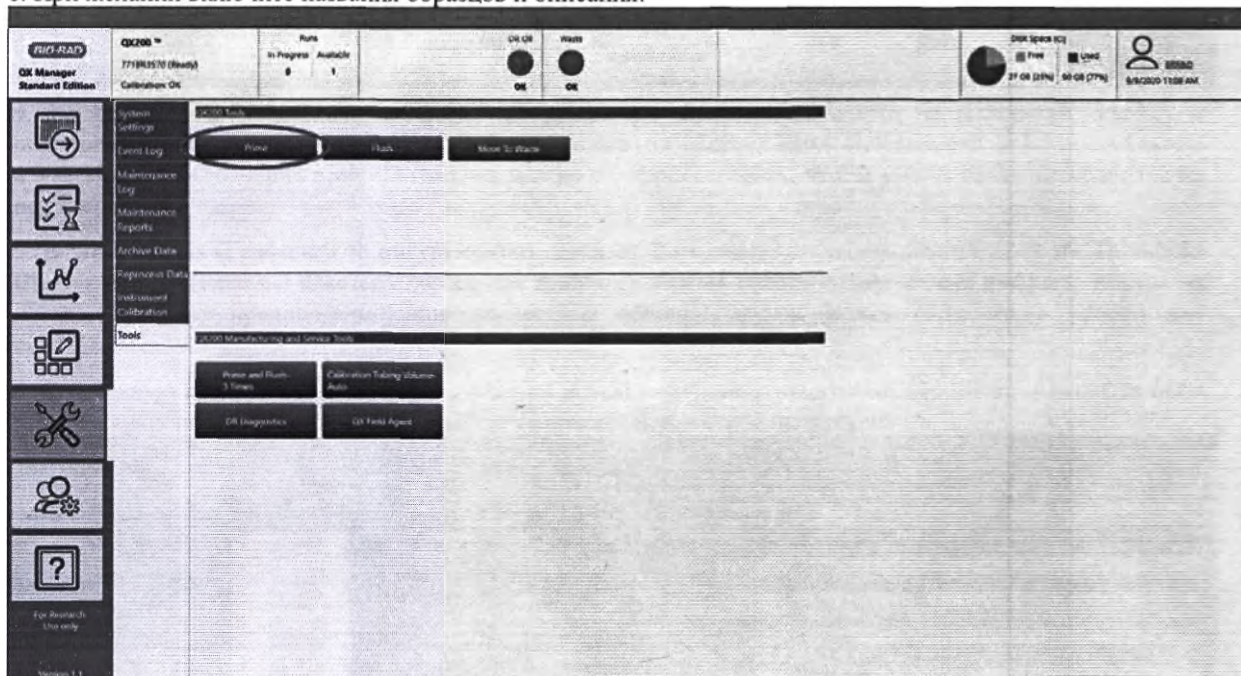
Если вы хотите включить дополнительную информацию о прогоне, это можно сделать на вкладке «Информация о скважине».

а. Тип эксперимента: прямая количественная оценка

б. Тип анализа: смесь зондов, триплекс

* Имена целей: N1 (FAM), N2 (FAM / HEX) и RPP30 (HEX).

с. При желании включите названия образцов и описания.



8. После ввода названий лунок и завершения настройки планшета заправьте прибор, выбрав вкладку «Гаечный ключ и отвертка» с левой стороны. Затем выберите вкладку «Инструменты» и нажмите «Прайм». Рекомендуется заправлять прибор каждый день перед первым запуском.

9. Вернитесь на вкладку «Добавить планшеты» слева, затем нажмите кнопку «Начать прогон», чтобы начать процесс считывания капель.

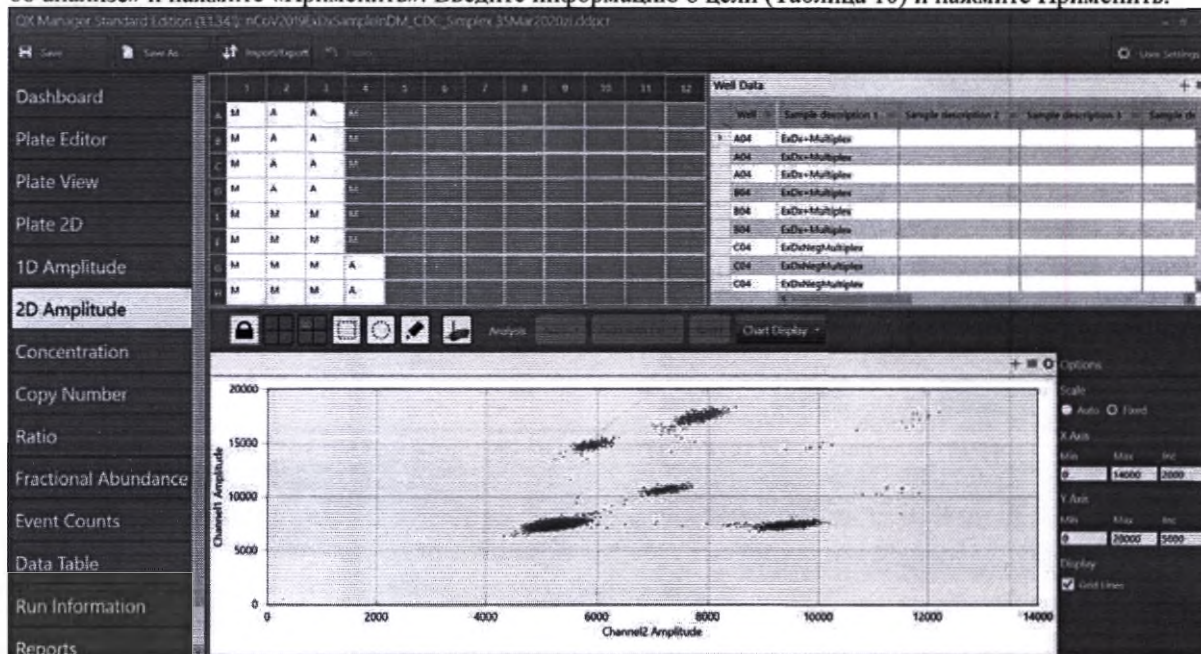
10. Во время сбора данных программное обеспечение будет отображать информацию о статусе прогона и может отображать данные о скважине во время прогона в окне анализа в реальном времени.

а. Чтобы получить к нему доступ, щелкните значок «Состояние выполнения» на вкладке «Информация о выполнении», затем нажмите «Открыть анализ в реальном времени». Это позволяет просматривать данные в реальном времени во время чтения устройством.

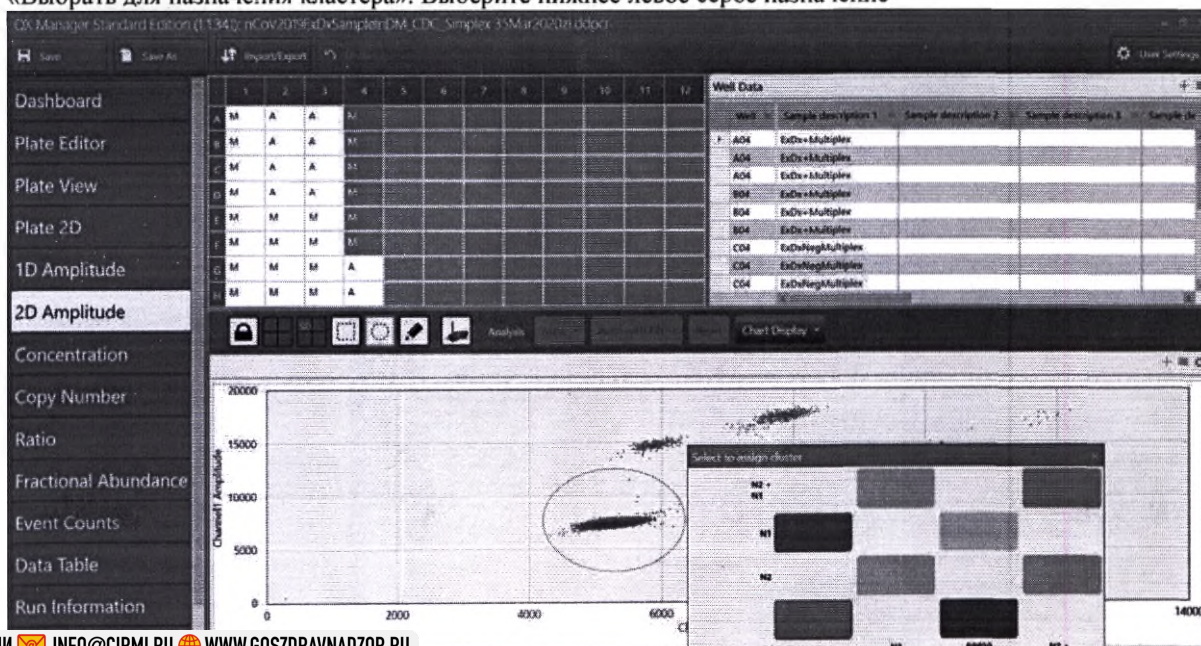
** Программа не позволит кластеризовать данные, а будет отображать только фенотипы кластеров.

Анализ данных с помощью QX Manager

1. Программа QX Manager открывает и анализирует файлы, созданные QuantaSoft Software 1.4 и более поздних версий.
2. После завершения чтения капель щелкните правой кнопкой мыши файл для анализа и выберите «Открыть с помощью». Выберите QX Manager. Либо откройте QX Manager и нажмите кнопку «Обзор» на вкладке «Анализ», чтобы найти файл данных для анализа.
3. Если шаблон был создан до считывания планшета, вся информация о лунках должна оставаться в файле данных, и этот шаг можно пропустить. На вкладке «Редактор плашек» выберите все лунки для анализа. С типом эксперимента как прямым количественным определением (DQ); выберите Probe Mix Triplex в разделе «Информация об анализе» и нажмите «Применить». Введите информацию о цели (Таблица 10) и нажмите Применить.

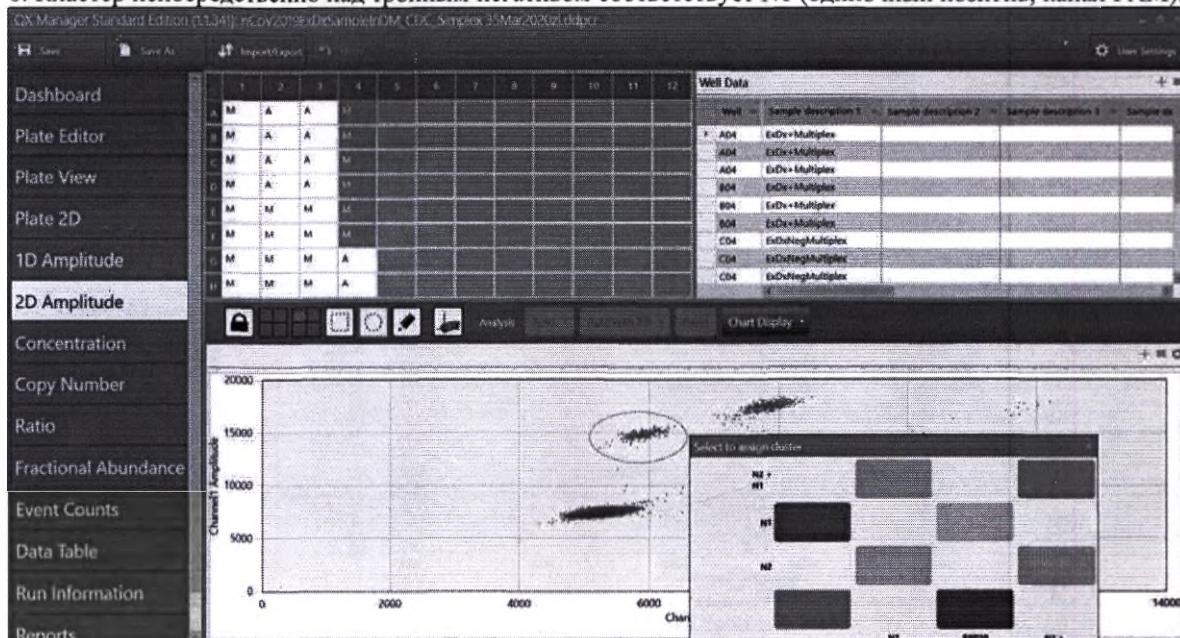


4. Во вкладке 2D Amplitude выберите все лунки для анализа. Щелкните на маленькую иконку с шестеренкой справа от 2D-графика под **Options** (Опции) и выберите **Fixed** (Зафиксировано). Минимальные и максимальные значения осей 2D-графика можно откорректировать, чтобы убрать символы пробелов на периферии.
5. В **GraphTools** (Графические инструменты) слева от 2-мерного графика выберите один из **Threshold Cluster Modes** (Режимы кластера пороговых величин). Режим предпочтения можно выбрать, исходя из пользовательских предпочтений; инструмент для обводки кругом может быть очень удобен для пользователя.
6. С помощью курсора мыши выберите нижний левый (тройной отрицательный) кластер. Появится окно «Выбор для назначения кластера». Выберите нижнее левое серое назначение

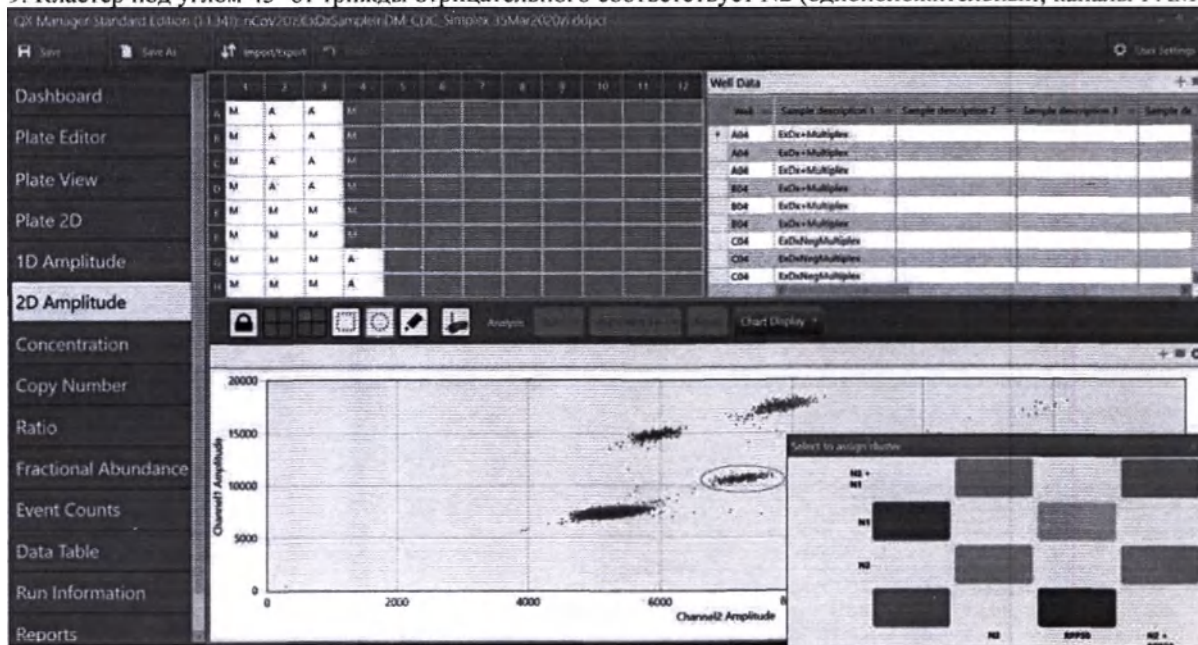


7. Повторите выделение и присвоение определений кластерам всем кластерам.

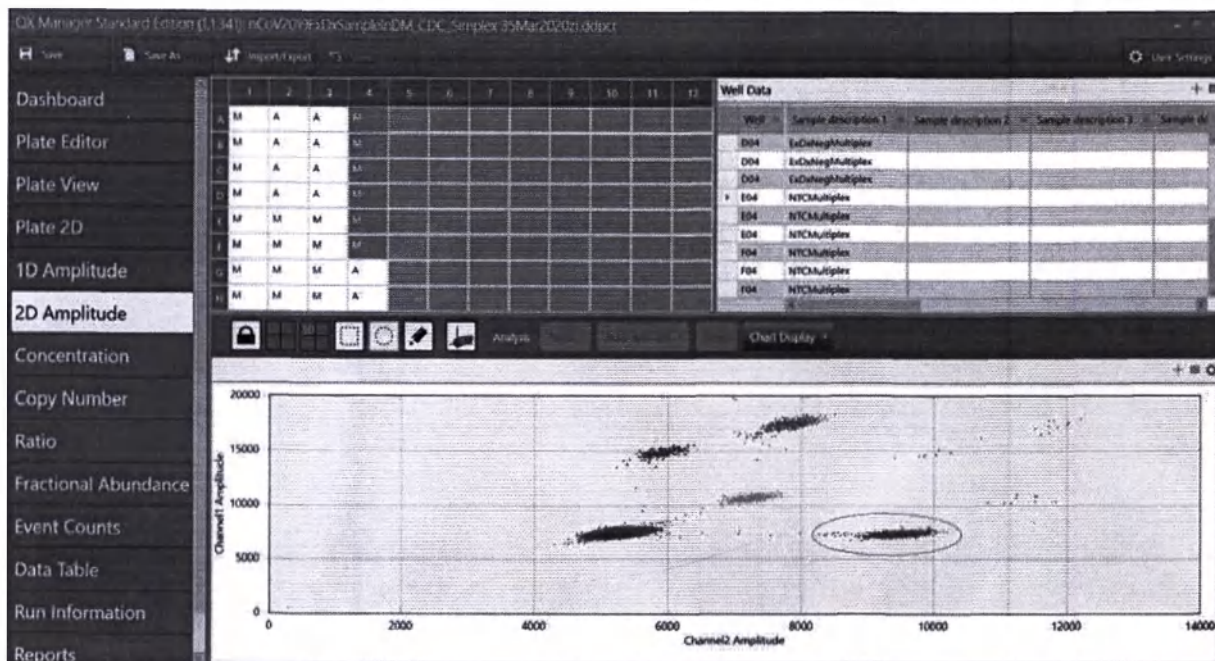
8. Кластер непосредственно над тройным негативом соответствует N1 (одиночный позитив, канал FAM).



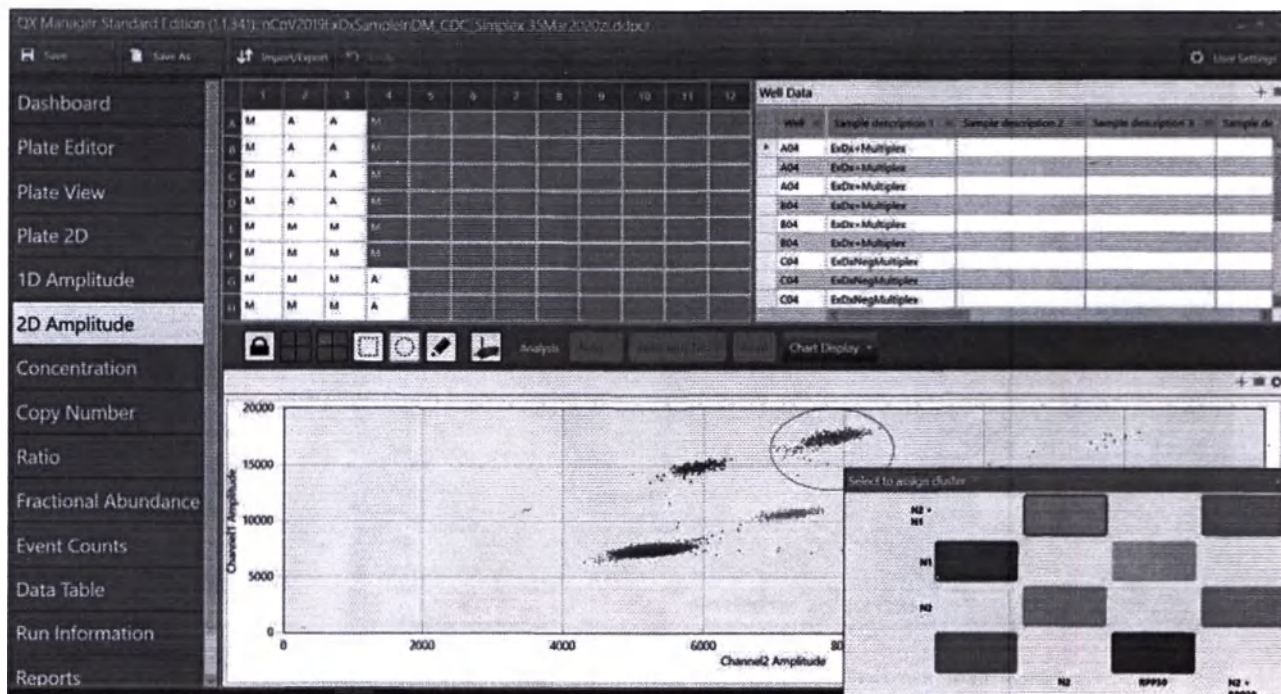
9. Кластер под углом 45° от тройного отрицательного соответствует N2 (одноположительный; каналы FAM и HEX).



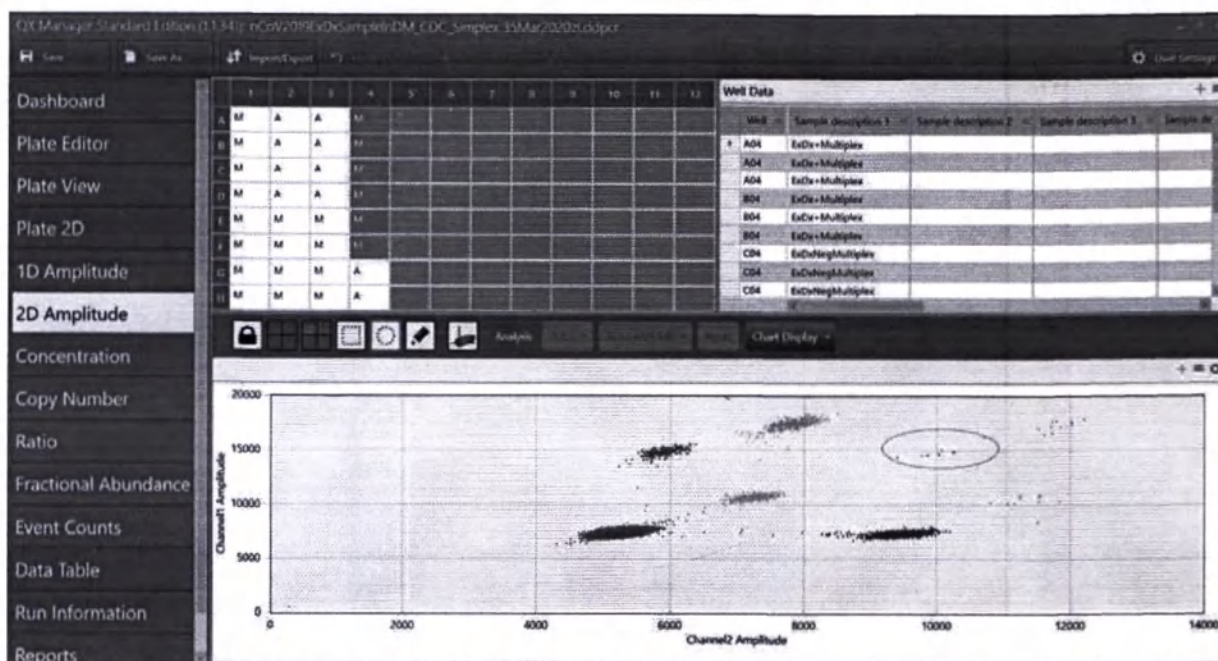
10. Кластер непосредственно справа от тройного отрицательного кластера соответствует RP (одиночный положительный, канал HEX).



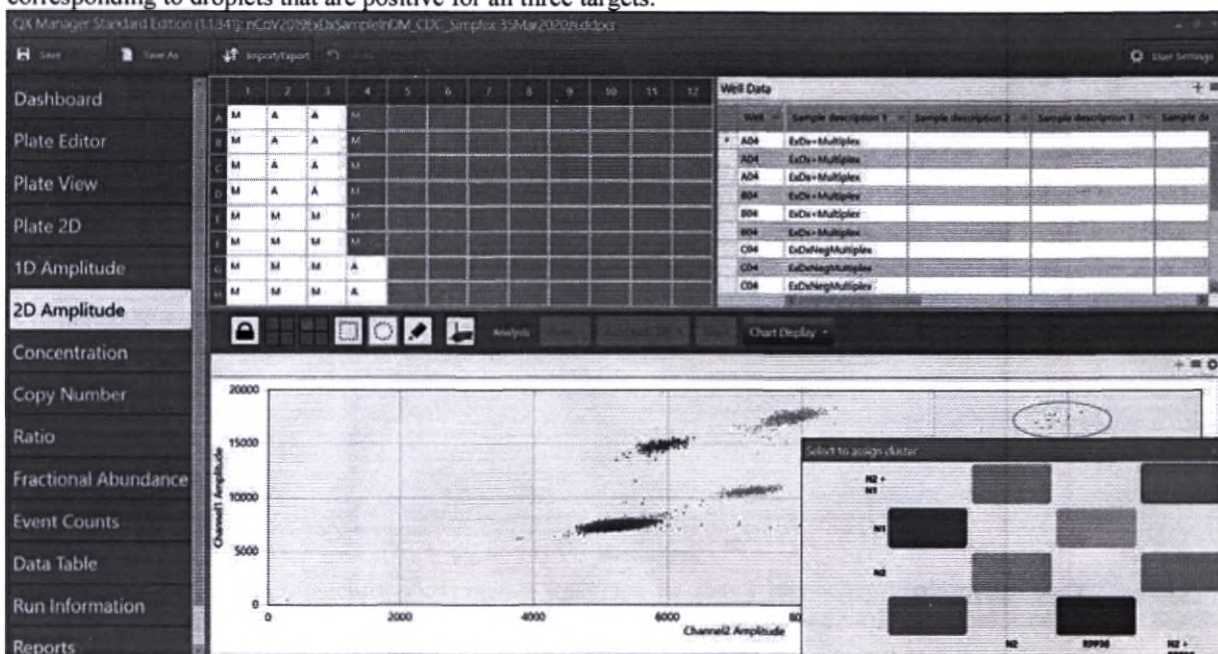
11. Выше одноположительных кластеров N1 и N2 находится двойной положительный кластер, соответствующий каплям, которые являются как N1, так и N2 положительными.



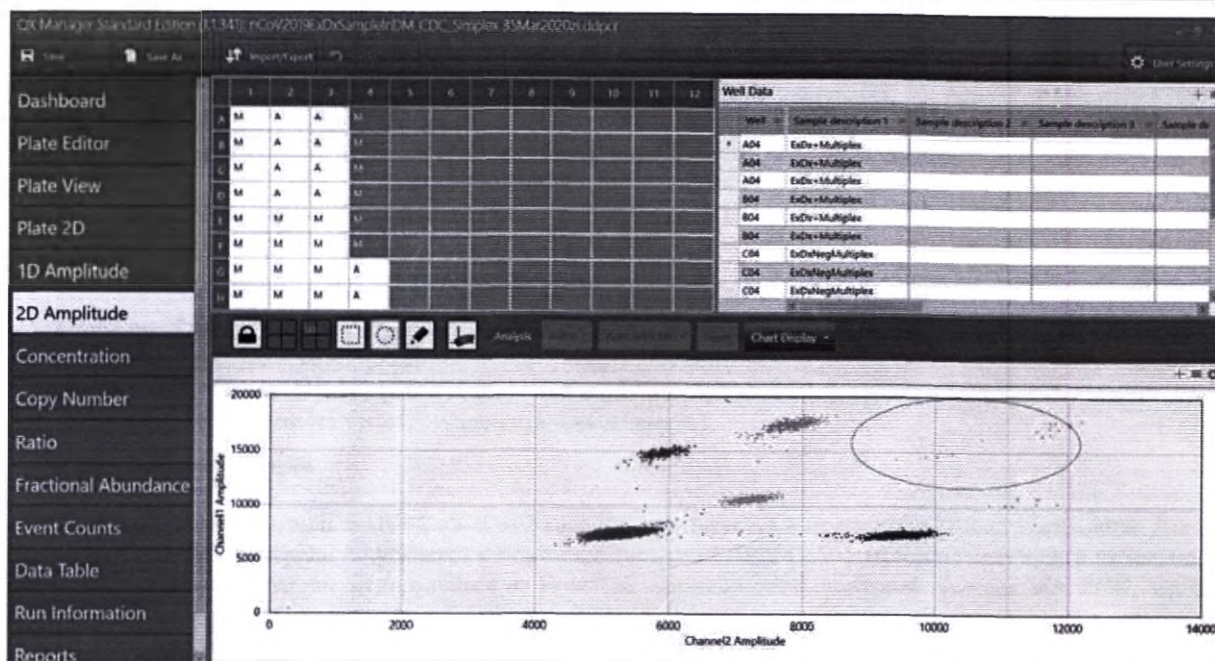
12. Над одноположительным кластером RP есть двойной положительный кластер, соответствующий каплям, которые являются как N1, так и RP положительными.



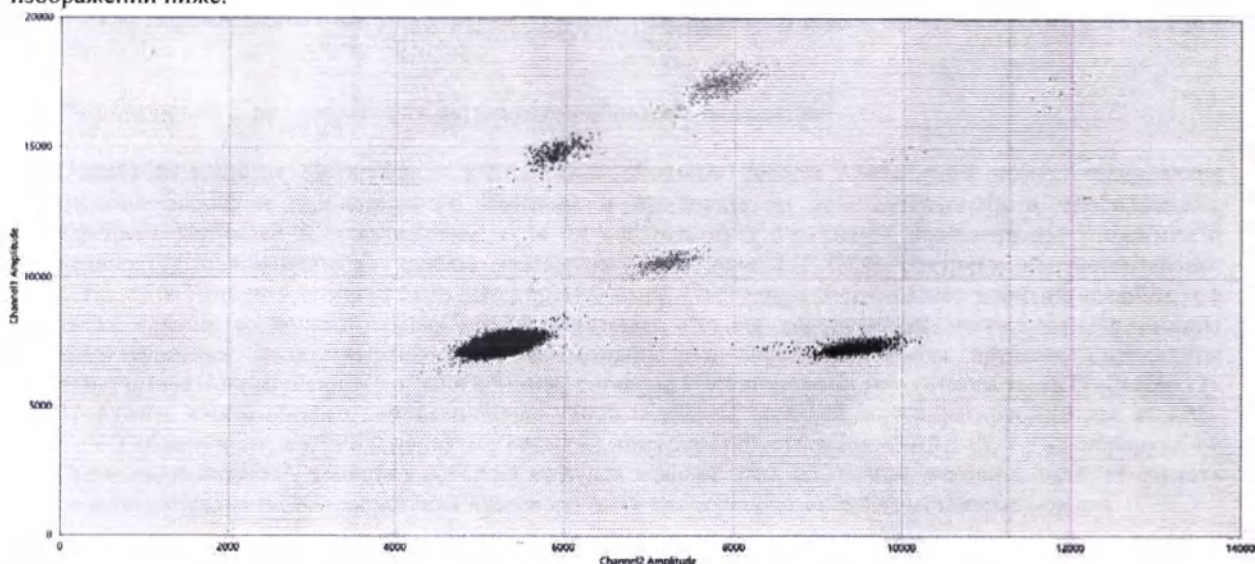
13. To the right of the N1 and N2 double-positive cluster there is an N1, N2 and RP triple-positive cluster corresponding to droplets that are positive for all three targets.



14. Под тройным положительным кластером находится двойной положительный кластер N2 и RP, соответствующий каплям, которые являются как N2, так и RP положительными.



15. При выборе применяются кластерные назначения. Окончательная конфигурация будет выглядеть как на изображении ниже.



Примечание. После применения обозначения кластера ко всему планшету необходимо выбрать каждую лунку и проверить соответствующие кластеры. Используйте инструмент «Циклический переход в режим пороговой кластеризации», чтобы переназначить плотные кластеры для каждой лунки и проверить неточную кластеризацию или кластеры, которые не были полностью выбраны.

19. Количественные данные представлены в окне «Данные о лунке» в правом верхнем углу. Используйте значок с тремя полосами в верхнем правом углу таблицы «Данные скважины» для экспорта данных в Excel / csv. Это также можно сделать через вкладку «Таблица данных» слева.

20. Концентрация указывается в копиях / мкл конечной реакции 1X ddPCR для каждой из мишеней (N1, N2 и RP).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необходимо проверить все испытательные контрольные образцы, прежде чем интерпретировать результаты пациента. Если контрольные образцы не действительны, результаты пациента не могут быть интерпретированы.

1. Контроли для теста на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от Bio-Rad - положительные, отрицательные и экстрагированные

Безматричный контроль (NTC)

использовании в одноступенчатой реакции ПЦР с обратной транскрипцией. Реакции безматричного контроля для смеси триплексных зондов не должны демонстрировать положительный сигнал в каком-либо канале (HEX или FAM) для любой из трех тестируемых мишеней, N1, N2 или RP. Если какая-либо из реакций безматричного контроля демонстрирует положительный сигнал, возможно, произошло загрязнение образца. Аннулируйте результаты и повторите анализ с остаточной экстрагированной нуклеиновой кислотой, строго соблюдая рекомендации. Если результат повторного теста положительный, повторно экстрагируйте и протестируйте все образцы, которые были включены в эту партию.

Положительный контроль SARS-CoV-2

Стандарт SARS-CoV-2 от компании Exact Dx используется в качестве положительного контроля и состоит из РНК, транскрибированной *in vitro*, и дает положительный результат со следующими наборами праймеров и зондов: N1, N2 ($\geq 28,8$ копий/мкл и ≥ 170 положительных капель для каждой мишени N1 и N2) и RP ($\geq 10,8$ копий/мкл и ≥ 150 положительных капель).

Контроль экстракции

Отрицательный контроль SARS-CoV-2 от Exact Dx используется в качестве контроля экстракции. Когда отрицательный контроль запускается с помощью теста на SARS-CoV-2 методом цифрового капельного ПЦР от Bio-Rad, то он используется в качестве процедурного контроля экстракции РНК, чтобы продемонстрировать успешное извлечение РНК, а также целостность экстракционного реагента. Отрицательный контроль состоит из общего количества нуклеиновых кислот, экстрагированных из неинфекционного культивированного клеточного материала человека. Очищенная нуклеиновая кислота должна демонстрировать положительный результат с набором праймеров и зондов RP ($\geq 10,8$ копий/мкл и ≥ 150 положительных капель) и отрицательные результаты со всеми маркерами SARS-CoV-2 ($\leq 0,1$ копий/мкл и ≤ 1 положительной капли).

2. Исследование и интерпретация результатов образцов пациентов

Оценка результатов тестирования клинических образцов должна проводиться после исследования положительного и отрицательного контроля и признания их действительными и приемлемыми. Контроль считается действительным, если он соответствует ожидаемой концентрации копии/мкл и количеству положительных капель, указанных в Таблице 11. Если контроли недействительны, результаты пациента не могут быть интерпретированы. Программа рассчитывает значение копий/мкл, а также количество положительных капель. Учитывая, что все контроли демонстрируют надлежащие характеристики, пользователь может использовать эти параметры, чтобы вручную определить, присутствуют ли мишени N1 и N2 в образце, согласно Интерпретации результатов теста (Таблица 12). Требуется, чтобы образец демонстрировал ≥ 5000 принятых событий, интерпретируемых как «SARS-CoV-2 обнаружен», и ≥ 10000 принятых событий, интерпретируемых как «SARS-CoV-2 не обнаружен». Образцы, количество принятых событий которых меньше этих пороговых значений, следует считать недействительными. Интерпретация итогового теста представляет собой качественный анализ.

Ожидаемые характеристики контролей набора для диагностики SARS-CoV-2 методом капельной ПЦР от Bio-Rad приведены в Таблице 11 (см. следующую страницу).

Таблица 11. Ожидаемая заданная эффективность контрольных образцов для испытания Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR

Тип контрольного образца	Название внешнего контрольного образца	Используется для мониторинга	SARS-CoV-2		Внутренний контрольный образец	Ожидаемый показатель ср/мкл и (число положительных капель)		
			N1	N2		N1	N2	RP
Положительно	EDx SARS-CoV-2 Стандарт	Существенный сбой реагента, включая целостность праймера и зонда	Положительно	Положительно	Положительно	$\geq 28,8$ (≥ 170)	$\geq 28,8$ (≥ 170)	$\geq 10,8$ (≥ 150)
Отрицательно	NTC	Загрязнение реагента и (или) окружающей среды	Отрицательно	Отрицательно	Отрицательно	Не обнаружен		

Экстракция	EDx SARS- CoV-2 Отрицательн о	Сбой процедуры экстракции	Отрицатель но	Отрицатель но	Положитель но	$\leq 0,1^*$ (≤ 1)	$\leq 0,1^*$ (≤ 1)	$\geq 10,8$ (≥ 4)
------------	---	------------------------------	------------------	------------------	------------------	------------------------------	------------------------------	-----------------------------

* $\leq 0,1$ (≤ 1); значения ниже LoB для анализа ddPCR и считаются отрицательными для N1 и N2

Рибонуклеаза Р (внутренний контроль)

Все клинические образцы должны демонстрировать положительный сигнал от праймеров и зонда рибонуклеазы Р, что указывает на присутствие гена рибонуклеазы Р человека. Отсутствие рибонуклеазы Р в каких-либо клинических образцах может указывать на:

- Неправильную экстракцию нуклеиновой кислоты из клинических материалов, приводящую к потере РНК и/или деградации РНК
- Отсутствие достаточного количества человеческого клеточного материала вследствие ненадлежащего сбора или потери целостности образца
- Неправильную подготовку и выполнение анализа
- Непригодность реагента или неисправность оборудования

Если анализ RP не дает положительного результата для клинических образцов человека, интерпретация выполняется следующим образом:

- Если N1 и/или N2 для SARS-CoV-2 являются положительными даже при отсутствии положительного RP, результат следует считать действительным. Возможно, некоторые образцы могут демонстрировать отсутствие каплей, положительных по рибонуклеазе Р, вследствие малого количества клеток в исходном клиническом образце. Отрицательный сигнал RP не исключает присутствия РНК вируса SARS-CoV-2 в клиническом образце.

Если все маркеры SARS-CoV-2 и рибонуклеазы Р являются отрицательными, то для данного образца результат следует считать недействительным. При наличии остаточного образца, повторите процедуру экстракции и тестирования. Если после повторного тестирования все маркеры остаются отрицательными, запротестируйте, что полученные результаты являются недействительными и, по возможности, соберите новый образец.

Маркеры SARS-CoV-2 (N1 и N2)

- Когда все контроли демонстрируют ожидаемые характеристики, образец считается отрицательным, если все маркеры SARS-CoV-2 (N1, N2) не демонстрируют положительных каплей, и рибонуклеаза Р демонстрирует положительные капли.
- Когда все контроли демонстрируют ожидаемые характеристики, образец считается положительным на SARS-CoV-2, если маркеры SARS-CoV-2 N1 и/или N2 демонстрируют положительные капли. Результат для SARS-CoV-2 останется действительным вне зависимости от того, является ли рибонуклеаза Р положительной или нет.
- Когда все контроли демонстрируют ожидаемые характеристики, но отсутствуют положительные капли для маркеров SARS-CoV-2 (N1, N2) ИЛИ для рибонуклеазы Р, то результат является недействительным. РНК, экстрагированную из образца, следует протестировать повторно. При отсутствии остаточной РНК, повторно экстрагируйте РНК из остаточного образца и повторите тест. Если повторно протестированный образец отрицателен для всех маркеров и рибонуклеазы Р, результат является недействительным, и следует рассмотреть возможность сбора нового образца у пациента.
- Если контроль экстракции (SARS-CoV-2 отрицательный) положителен для маркеров N1 или N2, это означает, что в процессе экстракции или обработки образца могло произойти загрязнение. Аннулируйте все результаты для образцов, взятых вместе с контролем экстракции. Повторно извлеките образцы, контроль экстракции и проведите повторный тест.

Табличная версия Руководства по интерпретации представлена в Таблице 12. Концентрация (копии/мкл) и количество положительных каплей отображаются в программе QuantaSoft Analysis Pro для каждой протестированной лунки. Для облегчения интерпретации пользователь может обратиться к данной таблице.

Таблица 12. Руководство по интерпретации результатов теста Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR

SARS-CoV-2 N1 Ожидаемый показатель ср/мкл (кол-во положительных капель)	SARS-CoV-2 N2 Ожидаемый показатель ср/мкл (кол-во положительных капель)	RP Ожидаемый показатель ср/мкл (кол-во положительных капель)	Расшифровка	Действия
Отрицательно <0,1 (<2)	Отрицательно <0,1 (<2)	Положительно $\geq 0,2$ (≥ 4)	SARS-CoV-2 не обнаружен	—

Положительно $\geq 0,1$ (≥ 2)	Положительно $\geq 0,1$ или (≥ 2)	Положительный или отрицательный	SARS-CoV-2 обнаружен.	Храните образцы при -70 °C и, если требуется, обратитесь в соответствующую медицинскую лабораторию.
Отрицательно <0,1 (<2)	Отрицательно <0,1 (<2)	Отрицательно <0,2 (>4)	Недействительно	Повторите экстракцию и RT-ddPCR. Если повторный результат по-прежнему является недействительным, рассмотрите возможность получения нового образца от пациента.
Если только одна из двух мишеней является положительной $\geq 0,1$ (≥ 2)		Положительный или отрицательный	SARS-CoV-2 обнаружен.	Храните образцы при -70 °C и, если требуется, обратитесь в соответствующую медицинскую лабораторию.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от Bio-Rad оценивался только с точки зрения использования в системах цифровой капельной ПЦР QX200 и QXDx.
2. Получение надежных результатов зависит от надлежащего выполнения процедур сбора, хранения и обращения с образцами.
3. Этот тест предназначен для выявления РНК SARS-CoV-2 мазков из носоглотки, переднего и среднего отдела полости носа, а также из образцов носоглоточного смыва/аспирата и образцов назального аспирата, собранных в универсальную транспортную среду (UTM) или универсальную транспортную систему для вирусов (UVT). Исследование других типов образцов с помощью теста на диагностику SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР может привести к неточным результатам.
4. На обнаружение РНК SARS-CoV-2 могут влиять методы сбора образцов, особенности пациента (например, наличие симптомов) и/или стадия инфекции.
5. Носоглоточный смыв/аспира́т или назальный аспира́т являются дополнительными приемлемыми образцами из верхних дыхательных путей, которые можно протестировать с помощью теста на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР; однако характеристики тест-системы при использовании данных типов образцов не были определены.
6. Носоглоточный смыв/аспира́т или назальный аспира́т, а также образцы из переднего и среднего отдела полости носа, собранные самостоятельно или медицинским работником, являются дополнительными приемлемыми образцами из верхних дыхательных путей, которые можно протестировать с помощью набора для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР; однако характеристики тест-системы при использовании данных типов образцов не были определены.
7. Результаты тестирования с использованием набора для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР являются количественными, включая количество копий/мкл и количество положительных капель. Пользователь оценивает данные пороговые значения на концентрацию образца, а также на наличие положительных капель для выполнения качественного анализа обнаруженного или не обнаруженного SARS-CoV-2; однако представленные в отчете значения не следует использовать или интерпретировать как количественные.
8. Вследствие существенных различий между методиками рекомендуется, чтобы до перехода с одной методики на другую пользователи провели корреляционные исследования методов в своей лаборатории, чтобы определить различия в методиках. Не следует ожидать стопроцентного совпадения результатов вследствие вышеупомянутых различий между методиками. Пользователи должны следовать своим собственным политикам/процедурам.
9. Ложноотрицательные или недействительные результаты могут быть получены из-за помех. В набор для диагностики на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от Bio-Rad включен внутренний контроль для идентификации образцов, содержащих вещества, которые могут препятствовать выделению нуклеиновых кислот и амплификации ПЦР.

ТЕХНИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Предел детектирования (LoD) определяет самую низкую выявляемую концентрацию SARS-CoV-2, при которой не менее 95% от общего количества (истинно положительных) репликатов демонстрируют положительные результаты теста. Для определения LoD инактивированный нагреванием вирус из коммерческого источника (ATCC SARS-CoV-2 штамм VR-1986HK, 390Е6 копий / мл) серийно разводили в пулированной матрице мазков из носоглотки. Всего было протестировано 9 уровней концентраций с 10-кратными серийными разведениями между уровнями с 3 повторностями экстракции на концентрацию и одной репликой RT-ddPCR на экстракцию на уровень. Это было выполнено в трех наборах, по одному для каждого метода экстракции, утвержденного для использования с набором для ддПЦР Bio-Rad SARS-CoV-2: руководство QIAamp Viral RNA, руководство Thermo MagMAX и Thermo MagMAX в системе KingFisher Flex. Каждый набор для ручной экстракции запускался и анализировался с помощью обоих вариантов программного обеспечения: QuantaSoft 1.7 и QuantaSoft Analysis Pro 1.0 или QX Manager 1.1. Набор для экстракции KingFisher Flex запускался с QuantaSoft 1.7 и анализировался с помощью QuantaSoft Analysis Pro 1.0. Тестирование LoD было завершено на термоциклере C1000 Touch с 96-луночным реакционным модулем. Результаты предварительных исследований по определению дальности приведены в Таблице 13 и Таблице 17 для планшетов, запускаемых с рабочим процессом QuantaSoft и QX Manager 1.1, соответственно.

Подтверждение LoD было определено на основе самой низкой концентрации, при которой 3/3 повторов были положительными для обеих мишеней (400 копий / мл), плюс два 2-кратных серийных разведения ниже (200 и 100 копий / мл), каждое с 20 отдельными экстракциями повторяется. После первоначального подтверждающего тестирования требовалось от одного до двух дополнительных промежуточных уровней (180 и 150 копий / мл) для определения LoD, каждый с 20 отдельными повторностями экстракции. LoD для обоих наборов для экстракции, набора для выделения нуклеиновых кислот вирусов / патогенов Thermo MagMAX (ручного и автоматического на системе KingFisher Flex) и мини-набора для вирусной РНК QIAamp, составлял 150 копий / мл, как показано в Таблице 14, Таблице 15 и Таблице 16, соответственно для планшетов, запускаемых с QuantaSoft 1.7 и анализируемых с помощью QuantaSoft Analysis Pro 1.0. Подтверждающие исследования LoD для образцов, извлеченных с помощью ручных методов MagMAX и QIAamp и проанализированных с помощью QX Manager 1.1, показаны в Таблице 18 и Таблице 19. Исследования LoD с использованием набора для ддПЦР Bio-Rad SARS-CoV-2 подтвердили эквивалентность наборов для экстракции нуклеиновых кислот (ручной и автоматический протоколы) и обеих программных платформ, включая приложения QuantaSoft и QX Manager.

Таблица 13. Начальный предел обнаружения - Оценка теста Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR

SARS-CoV-2 копий/мл	Образцы, экстрагированные с помощью Thermo MagMAX				Образцы, экстрагированные с помощью QIAampViral RNA	
	N1 Положительные копии / Общее кол-во копий	N2 Положительные копии / Общее кол-во копий	N1 Положительные копии / Общее кол-во копий	N2 Положительные копии / Общее кол-во копий	N1 Положительные копии / Общее кол-во копий	N2 Положительные копии / Общее кол-во копий
4.E+07	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
4.E+06	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
4.E+05	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
4.E+04	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
4000	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
400	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
40	1/3	1/3	1/3	1/3	3/3	0/3
4	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
0.4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Таблица 14. Предел обнаружения* Подтверждение теста Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Предел обнаружения с использованием набора для экстракции Thermo MagMAX, ручной протокол (программное обеспечение: QuantaSoft 1.7 + QuantaSoft Analysis Pro 1.0)

Концентрация образцов, копий/мл	ddPCR Концентрация (копий/мл)		Проверено образцов	Положительные образцы	% положительных
	N1	N2			
		Avg	Станд.		

		откл		откл			
400	0.94	0.29	0.95	0.37	20	20	100%
200	0.50	0.22	0.43	0.16	20	20	100%
180	0.29	0.22	0.34	0.19	20	19	95%
150	0.26	0.15	0.23	0.20	20	19	95%
100	0.23	0.15	0.24	0.12	20	18	90%

Таблица 15. Предел обнаружения набора для ddPCR Bio-Rad SARS-CoV-2 с использованием набора для экстракции Thermo MagMAX, автоматический протокол в системе KingFisher Flex (программное обеспечение: QuantaSoft 1.7 + QuantaSoft Analysis Pro 1.0)

Концентрация образцов, копий/мл	ddPCR Концентрация (копий/мл)				Проверено образцов	Положительные образцы	% положительных
	N1		N2				
	Avg	Станд. откл.	Avg	Станд. откл.			
400	0.47	0.19	0.46	0.13	20	20	100%
200	0.24	0.15	0.29	0.16	20	20	100%
150	0.23	0.11	0.26	0.12	20	20	100%
100	0.13	0.09	0.19	0.12	20	18	90%

Таблица 16. Предел обнаружения набора для ddPCR Bio-Rad SARS-CoV-2 с использованием набора для экстракции QIAamp Viral RNA (программное обеспечение: QuantaSoft 1.7 + QuantaSoft Analysis Pro 1.0)

Концентрация образцов, копий/мл	ddPCR Концентрация (копий/мл)				Проверено образцов	Положительные образцы	% положительных
	N1		N2				
	Avg	Станд. откл.	Avg	Станд. откл.			
400	0.95	0.26	0.88	0.26	20	20	100%
200	0.43	0.20	0.41	0.18	20	20	100%
180	0.35	0.17	0.28	0.12	20	19	95%
150	0.29	0.19	0.31	0.22	20	19	95%
100	0.28	0.22	0.22	0.21	20	17	85%

Таблица 17. Начальный предел обнаружения - Оценка теста Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Software: QX Manager 1.1

SARS-CoV-2 копий/мл	Образцы, экстрагированные с помощью Thermo MagMAX (ручной режим)				Образцы, экстрагированные с помощью QIAampViral RNA	
	N1 Положительные копии / Общее кол-во копий		N2 Положительные копии / Общее кол-во копий		N1 Положительные копии / Общее кол-во копий	N2 Положительные копии / Общее кол-во копий
4.E+07	3/3	3/3	3/3	3/3	4.E+07	3/3
4.E+06	3/3	3/3	3/3	3/3	4.E+06	3/3
4.E+05	3/3	3/3	3/3	3/3	4.E+05	3/3
4.E+04	3/3	3/3	3/3	3/3	4.E+04	3/3
4000	3/3	3/3	3/3	3/3	4000	3/3
400	3/3	3/3	3/3	3/3	400	3/3
40	1/3	2/3	0/3	2/3	40	1/3
4	1/3	0/3	0/3	0/3	4	1/3
0.4	0/3	0/3	0/3	0/3	0.4	0/3

Таблица 18. Предел обнаружения набора для ddPCR Bio-Rad SARS-CoV-2 с использованием набора для экстракции Thermo MagMAX extraction kit, manual protocol (Software: QX Manager 1.1)

ddPCR Концентрация (копий/мл)					Проверено образцов	Положительные образцы	% положительных
Концентрация образцов, копий/мл	N1		N2				
	Avg	Станд.	Avg	Станд.			

		откл		откл			
400	0.80	0.36	0.78	0.26	20	20	100%
200	0.49	0.15	0.54	0.20	20	20	100%
180	0.43	0.19	0.35	0.21	20	20	100%
150	0.31	0.17	0.31	0.18	20	19	95%
100	0.25	0.15	0.22	0.18	20	17	85%

Таблица 19. Предел обнаружения набора для ddPCR Bio-Rad SARS-CoV-2 с использованием набора для экстракции QIAamp Viral RNA extraction kit (Software: QX Manager 1.1)

Концентрация образцов, копий/мл	ddPCR Концентрация (копий/мл)				Проверено образцов	Положительные образцы	% положительных
	N1		N2				
	Avg	Станд. откл	Avg	Станд. откл			
400	0.99	0.60	0.93	0.32	20	20	100%
200	0.44	0.18	0.40	0.18	20	20	100%
180	0.30	0.16	0.34	0.14	20	19	95%
150	0.27	0.19	0.35	0.25	20	19	95%
100	0.25	0.19	0.22	0.22	20	16	80%

Инклюзивность

В наборе Bio-Rad SARS-CoV-2 используются те же последовательности для N1, N2 и RP, что и в утвержденном CDC анализе. CDC выполнили выравнивание с последовательностями олигонуклеотидного праймера и зонда диагностической панели CDC 2019 nCoV в режиме реального времени RT-PCR со всеми общедоступными последовательностями нуклеиновых кислот для SARS-CoV-2 в рамках Глобальной инициативы по обмену всеми данными о гриппе (GISAID, <https://www.gisaid.org>) по состоянию на 20 июня 2020 г., чтобы продемонстрировать прогнозируемую инклюзивность диагностической панели ОТ-ПЦР в реальном времени CDC 2019 nCoV. В этом исследовании использовалась оценка 31 623 доступных последовательностей SARS-CoV-2 в GISAID. За исключением одного нуклеотидного несоответствия с частотой > 1% (2,00%) в третьем положении зонда N1, частота всех несовпадений была <1%, что указывает на то, что распространенность несовпадений была спорадической. Только одна последовательность (0,0032%) имела два несовпадения нуклеотидов в зонде N1, а еще одна последовательность из другого изолята (0,0032%) имела два несовпадения нуклеотидов в обратном праймере N1. Не было обнаружено, что последовательности имеют более одного несовпадения в какой-либо области праймера / зонда N2.

Риск единственного несоответствия, приводящего к значительной потере реактивности и ложноотрицательному результату, невелик благодаря конструкции праймеров и зондов с температурами плавления > 60 °C и условиям проведения анализа с температурой отжига 55 °C. терпеть одно-два несовпадения.

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)

Виртуальный анализ на патогены, перечисленные в Таблице 20, был выполнен путем загрузки по одной эталонной последовательности на геном из базы генетических данных GenBank для каждого из организмов. Эталонные последовательности сравнивали с мишенями N1 и N2 SARS-CoV-2 от Bio-Rad для всех возможных комбинаций (прямой праймер, обратный праймер, зонд и обратные комплементы для всех компонентов) для определения процента гомологии. Если какая-либо из этих комбинаций праймеров наложилась на последовательность противоположных нитей с гомологией >80% для одной и той же мишени на небольшом расстоянии (<100 п.н.) друг от друга, то потенциальные амплификации были потеряны.

На основании данного виртуального анализа не ожидается какой-либо потенциальной непредусмотренной перекрестной реактивности, за исключением коронавируса SARS с мишенью N2.

Как сообщается в разрешении на использование в экстренных случаях от CDC, виртуальный анализ для набора праймеров/зондов N1 показал высокую гомологию последовательности зонда N1 с коронавирусом SARS и геномом SARS-подобного коронавируса летучих мышей. Однако прямой и обратный праймеры не продемонстрировали гомологии последовательности с коронавирусом SARS и геномом SARS-подобного коронавируса летучих мышей. Комбинирование праймеров и зондов привело к отсутствию значительной гомологии с геномом человека, другими коронавирусами или микрофлорой человека, что могло бы свидетельствовать о потенциальных ложноположительных результатах цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией.

*Анализ прямого праймера мишени N2 показал высокую гомологию с SARS-подобными коронавирусами последовательности для праймеров и зондов продемонстрировали

отсутствие значительной гомологии с геномом человека, другими коронавирусами или микрофлорой человека, что могло бы свидетельствовать о потенциальных ложноположительных результатах цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией. Комбинирование праймеров и зондов привело к отсутствию предсказаний касательно потенциальных ложноположительных результатов цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией.

Таблица 20. Виртуальный анализ на SARS-CoV-2

Виртуальное тестирование патогенов	Непреднамеренная перекрестная реактивность к N1	Непреднамеренная перекрестная реактивность к N2
Коронавирус SARS	Не обнаружена	Совпадение гомологии 92 %*
Коронавирус MERS	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека A	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека B1	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека B2	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека C	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека D	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека E	Не обнаружена	Не обнаружена
Аденовирус человека F	Не обнаружена	Не обнаружена
Метапневмовирус человека (hMPV)	Не обнаружена	Не обнаружена
Вирус парагриппа 1	Не обнаружена	Не обнаружена
Вирус парагриппа 2	Не обнаружена	Не обнаружена
Вирус парагриппа 3	Не обнаружена	Не обнаружена
Вирус парагриппа 4	Не обнаружена	Не обнаружена
Грипп A H3N2	Не обнаружена	Не обнаружена
Грипп A H2N2	Не обнаружена	Не обнаружена
Грипп A H7N9	Не обнаружена	Не обнаружена
Грипп A H1N1	Не обнаружена	Не обнаружена
Грипп B	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус человека A	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус человека B	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус E, Бычий энтеровирус	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус F	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус G, Свиной энтеровирус 9	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус H, Энтеровирус обезьяны A	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус J штамм 1631	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус J штамм N203	Не обнаружена	Не обнаружена
Респираторно-синцитиальный вирус	Не обнаружена	Не обнаружена
Риновирус A, Риновирус человека 89	Не обнаружена	Не обнаружена
Риновирус A, штамм риновируса человека 1 ATCC VR-1559	Не обнаружена	Не обнаружена
Риновирус B	Не обнаружена	Не обнаружена
Риновирус C, Риновирус человека C	Не обнаружена	Не обнаружена
Риновирус C, Риновирус человека NAT001	Не обнаружена	Не обнаружена
Гемофильная палочка	Не обнаружена	Не обнаружена
Legionella pneumophila	Не обнаружена	Не обнаружена
Mycobacterium tuberculosis	Не обнаружена	Не обнаружена
Streptococcus pneumoniae	Не обнаружена	Не обнаружена
Пиогенный стрептококк	Не обнаружена	Не обнаружена
Энтеровирус (т.е., EV68)	Не обнаружена	Не обнаружена
Пневмоцистная пневмония	Не обнаружена	Не обнаружена

Интерференция

исследования эндогенных интерференционных веществ:

В анализе будут использоваться традиционные хорошо зарекомендовавшие себя методы экстракции нуклеиновых кислот:

- Thermo MagMAX Viral/Pathogen Nuclei Acid Isolation Kit использует классический метод разрушения образцов в растворе на основе тиоцианата гуанидиния, который быстро высвобождает вирусную РНК и ДНК при одновременной инактивации нуклеаз в матрице образца. Затем к образцу добавляют парамагнитные шарики с поверхностью связывания нуклеиновых кислот для связывания нуклеиновых кислот. Шарики/нуклеиновые кислоты захватываются магнитами, в то время как белки и другие загрязняющие вещества смываются. Затем шарики снова промывают, чтобы удалить остатки связывающего раствора. Нуклеиновые кислоты элюируют в небольшом объеме элюионного буфера. Обратите внимание, что эта процедура восстанавливает общее количество нуклеиновых кислот, поэтому, если клетки присутствуют в образце, клеточная ДНК/РНК будет восстановлена вместе с вирусной РНК.

- QIAamp Viral RNA Mini kit сочетает в себе селективные связывающие свойства мембраны на основе кремнезема со скоростью микропиновой или вакуумной технологии и очень подходит для одновременной обработки нескольких образцов. Образец сначала лизируют в условиях высокой денатурации, чтобы инактивировать РНКазы и обеспечить выделение интактной вирусной РНК. Затем условия буферизации корректируются для обеспечения оптимального связывания РНК с мембраной QIAamp, и образец загружается на мини-спиновую колонку QIAamp. РНК связывается с мембраной, и загрязняющие вещества эффективно смываются в два этапа с использованием двух различных буферов промывки. Высококачественная РНК элюируется в специальном свободном от РНКаз буфере, готовом к непосредственному использованию или безопасному хранению.

Обнаружение происходит с помощью капельной цифровой ПЦР, мы не ожидаем вмешательства со стороны обычных эндогенных веществ. Интерференционные исследования для этого анализа проводиться не будут.

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

Эффективность теста Bio-Rad для диагностики SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР с клиническими образцами мазка из носоглотки оценивалась с использованием 40 индивидуальных отрицательных клинических образцов и 39 подтвержденных положительных клинических образцов, собранных у пациентов с признаками и симптомами инфекции верхних дыхательных путей. Сбор клинических образцов выполнялся квалифицированным персоналом в соответствии с инструкцией на вкладыше упаковке устройства для сбора. Образцы хранились в замороженном виде при -80°C перед использованием.

Образцы были протестированы на COVID-19 в CerbaXpert (Париж, Франция) с помощью анализа Seegene Allplex™ 2019-nCoV (разрешено для использования в экстренных случаях EUA 4-21-2020) и признаны положительными или отрицательными в соответствии с инструкциями изготовителя.

Анализ Allplex представляет собой диагностический тест *in vitro* (IVD) в режиме реального времени методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR), предназначенный для качественного определения нуклеиновой кислоты тяжелого острого респираторного синдрома, вызываемого коронавирусом 2 типа (SARS-CoV-2), в образце мазка из носоглотки, ротоглотки, переднего и среднего отдела полости носа, и в образце мокроты у пациентов с признаками и симптомами инфекции при подозрении на COVID-19.

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили дважды с использованием набора из 79 образцов, один раз с использованием набора для выделения вирусных/патогенных нуклеиновых кислот ThermoFisher MagMAX и один раз мини набора для выделения вирусной РНК QIAamp. Отрицательные образцы и ряд клинических образцов с низким, средним и высоким положительным результатом были отобраны случайным образом для заслепленного исследования и протестированы с помощью теста Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR в термоциклере C1000 Touch с реакционным модулем на 96 глубоких лунок. Процент совпадения положительных результатов (PPA), а также процент совпадения отрицательных результатов (NPA) составили 94,87%, 95% доверительного интервала [81,37; 99,11] для набора образцов, выделенных с помощью Thermo MagMAX, как показано в Таблице 17. Показатель PPA составил 94,59%, 95% доверительного интервала [80,47; 99,06], а показатель NPA составил 95,00%, 95% доверительного интервала [81,79; 99,13] для набора образцов, выделенных с помощью мини набора для выделения вирусной РНК QIAamp, как показано в Таблице 19. Дискордантный анализ для 2 ложноположительных и 2 ложноотрицательных результатов был проведен с диагностической панели ОТ-ПЦР в реальном времени CDC 2019 nCoV, и эти результаты на 100% совпадали с набором для диагностики на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной ПЦР от Bio-Rad (Таблицы 18 и 20). Набор для диагностики на SARS-CoV-2 методом цифровой капельной

Таблица 21. Результаты PPA и NPA теста Bio-Rad SARS-CoV-2 (экстракция Thermo MagMAX) на фоне сравнительного теста

	Сравнительный тест положительный	Сравнительный тест отрицательный
Bio-Rad SARS-CoV-2 Положительный	37	2
Bio-Rad SARS-CoV-2 Положительный	2	37

PPA = 94,87 %, 95 % ДИ [81,37, 99,11]

NPA = 94,87 %, 95 % ДИ [81,37, 99,11]

В общей сложности 78 образцов подвергались анализу с использованием метода выделения Thermo MagMAX, поскольку один образец был исключен вследствие недействительного результата теста (внутренний контроль был отрицательным, например, не было обнаружено сигнала RP и отсутствовали положительные капли N1 или N2). Всего было обнаружено 4 случая несовпадения, которые были подтверждены посредством третьего теста – диагностической панели ОТ-ПЦР в реальном времени CDC 2019 nCoV. Подробная информация об исключенном случае, случаях несовпадения и подтвержденных результатах приведена в Таблице 18.

Таблица 18. Описание исключенных и случаев несоответствия.

Идентификационный номер случая	Тест Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR	Сравнительный тест (тест Seegene – Экстренное разрешение на применение)	Подтверждающий тест (Анализ CDA – Экстренное разрешение на применение)
132	Недействительно	Отрицательно	Отрицательный N1 Cq = НД N2 Cq = НД RP Cq = 25,41
619	Положительно Концентрация N1 = 0,182 сП/мкл Концентрация N2 = 0,364 сП/мкл Концентрация RP = 71,6 сП/мкл	Отрицательно	Положительный N1 Cq = 33,33 N2 Cq = 35,6 RP Cq = 26,83
127	Положительно Концентрация N1 = 0,171 сП/мкл Концентрация N2 = 0,514 сП/мкл Концентрация RP = 277 сП/мкл	Отрицательно	Положительный N1 Cq = 35,52 N2 Cq = 41,48 (отрицательный) RP Cq = 26,65
818	Отрицательно Концентрация N1 = 0 сП/мкл Концентрация N2 = 0 сП/мкл Концентрация RP = 71,7 сП/мкл	Положительно	Отрицательный N1 Cq = НД N2 Cq = НД RP Cq = 27,05
398	Отрицательно Концентрация N1 = 0 сП/мкл Концентрация N2 = 0 сП/мкл Концентрация RP = 49,1 сП/мкл	Положительно	Отрицательный N1 Cq = НД N2 Cq = НД RP Cq = 26,6

Таблица 22. Результаты PPA и NPA теста Bio-Rad SARS-CoV-2 (QIAamp экстракция вирусной РНК) в сравнении со сравнительным тестом

	Сравнительный тест положительный	Сравнительный тест отрицательный
Bio-Rad SARS-CoV-2 Положительный	35	2
Bio-Rad SARS-CoV-2 Отрицательный	2	38

PPA = 94,59 %, 95 % ДИ [80,47, 99,06]

NPA = 95,00 %, 95 % ДИ [81,79, 99,13]

В общей сложности 77 образцов подвергались анализу с использованием метода выделения вирусной РНК QIAamp, поскольку два образца были исключены вследствие недостаточного количества образцов, доступных для выделения. Были идентифицированы те же 4 случая несовпадения. Результаты для исключенных случаев и случаев несовпадения представлены в Таблице 20.

Таблица 23. Описание исключенных и случаев несоответствия.

Идентификационный номер случая	Тест Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR	Сравнительный тест (тест Seegene – Экстренное разрешение на применение)	Подтверждающий тест (Анализ CDA – Экстренное разрешение на применение)
998	Недостаточно образцов для	Положительно	НД

	тестирования		
44	Недостаточно образцов для тестирования	Положительно	НД
619	Положительно Концентрация N1 = 0,166 сП/мкл Концентрация N2 = 0,498 сП/мкл Концентрация RP = 59,1 сП/мкл	Отрицательно	Положительный N1 Cq = 33,33 N2 Cq = 35,6 RP Cq = 26,83
127	Положительно Концентрация N1 = 0,383 сП/мкл Концентрация N2 = 0,230 сП/мкл Концентрация RP = 124 сП/мкл	Отрицательно	Положительный N1 Cq = 35,52 N2 Cq = 41,48 (отрицательный) RP Cq = 26,65
818	Отрицательно Концентрация N1 = 0 сП/мкл Концентрация N2 = 0 сП/мкл Концентрация RP = 59,6 сП/мкл	Положительно	Отрицательный N1 Cq = НД N2 Cq = НД RP Cq = 27,05
398	Отрицательно Концентрация N1 = 0 сП/мкл Концентрация N2 = 0 сП/мкл Концентрация RP = 51,1 сП/мкл	Положительно	Отрицательный N1 Cq = НД N2 Cq = НД RP Cq = 26,6

Тестирование эталонной панели FDA SARS-CoV-2

Оценка чувствительности и перекрестной реактивности БВРС-КоВ проводилась с использованием эталонного материала (Т1), слепых образцов и стандартного протокола, предоставленного FDA. Исследование включало исследование диапазона и подтверждающее исследование LoD. Для установления специфичности и подтверждения LoD использовали слепое тестирование образцов. В качестве метода экстракции использовались набор для выделения патогенов / нуклеиновых кислот ThermoFisher MagMAX и система цифровой капельной ПЦР Bio-Rad QX200 AutoDG. Результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25. Сводка результатов подтверждения LoD с использованием справочной панели FDA SARS-CoV-2

Эталонный материал представленный FDA	Тип образца	Полученный LoD	Перекрестная реактивность
SARS-CoV-2	Мазки из носоглотки	0.6x103 NDU/mL	N/A
MERS-CoV		N/A	ND

NDU / мл = обнаруживаемые единицы РНК NAAT / мл

N / A: Не применимо

ND: не обнаружено

МАРКИРОВКА И УПАКОВКА

**SARS-CoV-2
ddPCR Kit**

REF 12013743

600 tests
Includes
1 vial of assay
6 vials of supermix
6 vials of reverse transcriptase
6 vials of DTT
2 vials of positive standard
2 vials of negative standard

Bio-Rad Laboratories, Inc. www.bio-rad.com
5731 W Las Positas Blvd, Pleasanton, CA 94588
Made in USA

Store at -20 °C.



(01)03610522181896
(17)991231
(10)XXXXXXXXXX

 bio-rad.com/SARSCoV2-ddPCR

 YYYY-MM-DD

LOT XXXXXXXX

 YYYY-MM-DD

10000128954 B

Symbol/Символ	Definition/Определение	
	Consult instruction for use	Обратитесь к инструкции по применению
	Catalog number	Номер в каталоге
	Date of manufacture	Дата изготовления
	Lot	Лот
	Expiry date	Годен до

Маркировка компонентов набора

1. Смесь праймеров и зондов для детекции РНК вируса SARS-CoV-2, 600 мкл



Маркировка содержит следующую информацию:

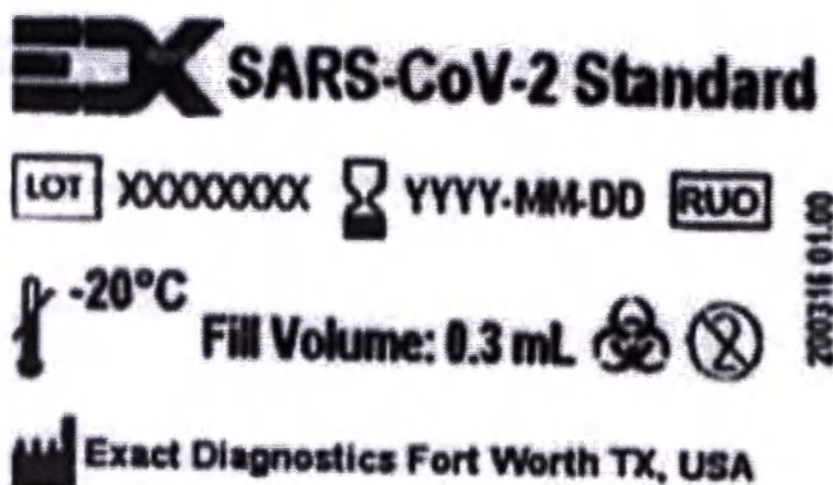
- логотип Bio-Rad
- штрих-код
- данные о контроле качества
- срок годности
- условия хранения
- наименование
- объем реагента во флаконе
- номер по каталогу
- информация о составе (FAM/HEX)
- информация о производителе

2. Обратная транскриптаза по 1 мл

3. DTT Дитиотреитол 300 мМ по 1 мл

4. Смесь реагентов для проведения одноступенчатой реакции RT-ddPCR для зондов, по 1 мл

5. Контрольный материал SARS-CoV-2 Positive (положительный), по 0,3 мл



- логотип производителя
- штрих-код
- лот
- срок годности
- условия хранения
- наименование
- объем реагента во флаконе
- биологическая опасность
- обозначение: для однократного использования

6. Контрольный материал SARS-CoV-2 Negative (отрицательный), по 0,3 мл

EDX SARS-CoV-2 Negative

LOT XXXXXXXX YYY-MM-DD RUO

-20°C

Fill Volume: 0.3 mL



2003170100



Exact Diagnostics Fort Worth TX, USA

- логотип производителя
- штрих-код
- лот
- срок годности
- условия хранения
- наименование
- объем реагента во флаконе
- обозначение: биологическая опасность
- обозначение: для однократного использования
- информация о производителе

Маркировка на русском языке

IVD

12013743

Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 ("SARS-CoV-2 ddPCR Kit") методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) в биологическом материале, в составе:

1. Смесь праймеров и зондов для детекции РНК вируса SARS-CoV-2, 600 мкл – 1 шт.
2. Обратная транскриптаза по 1 мл – 6 шт.
3. DTT Дитиотреитол 300 мМ по 1 мл – 6 шт.
4. Смесь реагентов для проведения одноступенчатой реакции RT-ddPCR для зондов, по 1 мл – 6 шт.
5. Контрольный материал SARS-CoV-2 Positive (положительный), по 0,3 мл – 2 шт.
6. Контрольный материал SARS-CoV-2 Negative (отрицательный), по 0,3 мл – 2 шт.
7. Инструкция по применению – 1 шт.

Только для диагностики *in vitro*

Регистрационное удостоверение № РЗН XXXX/XXX от ДД.ММ.ГГГГг. Номер серии, срок годности, условия хранения и графические символы указаны на оригинальной упаковке. Антитела к вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.
Производитель Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториз, Инк.", 5731 W. Las Positas Blvd PLEASANTON, CA 94588 UNITED STATES, США

Уполномоченный представитель производителя: ООО «Био-Рад Лаборатории»
Адрес: 105064, г. Москва, Нижний Сусальный переулок, дом 5, стр. 5А
Телефон: (495) 721 14 04 diag_support_rcis@bio-rad.com www.bio-rad.com
Страна происхождения: США

Информация об упаковке

Вторичная упаковка: картонная коробка
Размеры вторичной упаковки:

СРОК ГОДНОСТИ

Максимальный срок годности – 12 месяцев

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Набор расходных материалов подлежит транспортировке и хранению при соблюдении условий, указанных ниже

Хранение

Параметр	Значение
Температура воздуха, °C	(-15)-(-25)
Относительная влажность воздуха, без конденсата, %	20-80

Транспортировка

Параметр	Значение
Температура воздуха, °C	(-15)-(-25)
Относительная влажность воздуха, без конденсата, %	20-80

СТЕРИЛЬНОСТЬ

Не применимо. Изделие поставляется не стерильным.

Перечень национальных и международных нормативных документов, которым соответствует медицинское изделие

Номер стандарта	Описание
EN 13485:2016	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
EN 14971:2012	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN 13640:2002	Исследование стабильности реагентов для диагностики in vitro
EN 13975:2003	Процедуры отбора проб, используемые для приемных лабораторных испытаний медицинского диагностического оборудования. Статистические аспекты.
EN ISO 15193:2009	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Измерение величин в образцах биологического происхождения. Требования к содержанию и представлению референтных процедур измерения
EN ISO 15194:2009	Медицинские изделия для in vitro диагностики. Измерение величин в образцах биологического происхождения. Требования к аттестованным стандартным образцам и содержанию сопроводительной документации
EN ISO 17511:2003	Оборудование медицинское для диагностики in vitro. Количественные измерения в биологических образцах. Метрологическая прослеживаемость величин, заданных для калибраторов и контрольных материалов
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
EN 62366-1:2015	Изделия медицинские. Часть 1. Проектирование медицинских изделий с учетом эксплуатационной пригодности
EN 15223-1:2016	Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ УТИЛИЗАЦИИ

Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, а также использованные изделия следует утилизировать в соответствии с применимыми местными законами и правилами, и с соблюдением

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Компания Bio-Rad Laboratories гарантирует качество выпускаемой продукции и соответствие требованиям технической и эксплуатационной документации производителя, а также требованиям нормативной документации.

По вопросам, связанным с качеством продукции, обращаемой на территории РФ обращаться к представителю производителя Био-Рад лаборатории.

ПРАВИЛА ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ РЕКЛАМАЦИЙ

Поддержка пользователей осуществляется компанией:

Общество с ограниченной ответственностью "БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ"

Запросы и рекламации могут направляться по адресу: 105064, г. Москва, переулок Нижний Сусальный, д. 5, стр. 5а
Телефон: (495) 721 14 04, diag_support_rcis@bio-rad.com, www.bio-rad.com

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Центр по контролю и профилактике заболеваний. Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях, 5-е изд. Департамент здравоохранения и социального обеспечения США, Служба общественного здравоохранения, Центры по контролю и профилактике заболеваний, Национальные учреждения здравоохранения, Публикация Департамента здравоохранения и социального обеспечения США № 21-1112 (CDC), переизданная в декабре 2009 года.
2. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Защита работников лабораторий от профессиональных инфекций. Утвержденное руководство (4-е издание). Документ Института клинических и лабораторных стандартов M29-A4: Уэйн, Пенсильвания; Институт клинических и лабораторных стандартов, 2014. Зигель Р. Л., К. Д. Миллер и А. Джемаль, «Статистика рака за 2018». Онкологический журнал для клиницистов, 2018. 68(1): с. 7-30.

«Био-Рад
Лабораториз, Инк.»

Группа биомедицинских исследований	Сайт bio-rad.com , США 1 800 424 6723, Австралия 61 2 9914 2800, Австрия 43 01 877 89019, Бельгия 32 03 710 53 00, Бразилия 55 11 3065 7550, Великобритания 44 01923 47 1301, Венгрия 36 01 459 6190, Германия 49 089 3188 4393, Гонконг 852 2789 3300, Дания 45 04 452 10 00, Израиль 972 03 963 6050, Индия 91 124 4029300, Испания 34 091 49 06 580, Италия 39 02 49486600, Канада 1 905 364 3435, Китай 86 21 6169 8500, Корея 82 2 3473 4460, Мексика 52 555 488 7670, Нидерланды 310 318 540 666, Новая Зеландия 64 9 415 2280, Норвегия 47 0 233 841 30, ОАЭ 971 4 8187300, Польша 36 01 459 6191, Португалия 351 21 4727717, Россия 7 495 721 14 04, Сингапур 65 6415 3188, Таиланд 66 2 651 8311, Тайвань 886 2 2578 7189, Финляндия 35 08 980 422 00, Франция 33 01 479 593 00, Чехия 36 01 459 6192, Швейцария 41 0617 17 9555, Швеция 46 08 555 127 00, Южная Африка 36 01 459 6193, Япония 81 3 6361 7000
--	---

Sig 0119

BIO-RAD

Дата _____

От компании Био-Рад Лабораториз, Инк.

Мы, Био-Рад Лабораториз, Инк., компания, зарегистрированная по адресу: 5731 W. Las Positas Blvd PLEASANTON, CA 94588 UNITED STATES, США, настоящим подтверждаем, что прилагаемая инструкция по эксплуатации на русском языке верна, ее содержание соответствует действительности.

С уважением,

Подпись _____ /подпись/

_____ Марио Вейкер _____ / 21 июня 2021 г. _____

Должность

Старший вице-президент по обеспечению качества и нормативно-правовому регулированию

Подпись уполномоченного лица
13 июля 2021 г.

/подпись/
Джордж де ла Роз

Нотариус или другое должностное лицо, заполняющее этот сертификат, проверяет только личность человека, подписавшего документ, к которому прилагается этот сертификат, и не проверяет правдивость, точность или действительность этого документа.

ШТАТ КАЛИФОРНИЯ ОКРУГ АЛАМИДА

Подписал и дал присягу (или подтвердил) в моем присутствии в день
13 июля 2021 г. Джордж де ла Роз

_____ ,
доказав мне на основании достаточных свидетельств, что он является
лицом, находящимся передо мной.

_____ /подпись/
(Подпись нотариуса)

Печать нотариуса
СУНИЛ ДЖАСВАЛ
№ 2233425
КАЛИФОРНИЯ
ОКРУГ АЛАМИДА

/подпись/

Перевод данного текста выполнен переводчиком Котляровым Антоном Игоревичем.

Российская Федерация

Город Москва

Восемнадцатого октября две тысячи двадцать первого года

Я, Родина Ульяна Алексеевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Корсика Владимира Константиновича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Котлярова Антона Игоревича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2138-н/77-2021-46-2410

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



Родина

У.А. Родина

Всего прошитуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 33 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса

Родина

