



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«24» марта 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного выявления
РНК коронавируса (SARS-CoV-2)
методом прямой ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test»

ТУ 21.20.23-028-97638376-2020

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
А. Н. Тороповский
Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.



Содержание

Введение	3
1. Назначение.....	3
2. Принцип метода	5
3. Состав набора реагентов	7
4. Характеристики набора реагентов	9
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Cito-CoV-2-Test»	17
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	19
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	22
8. Анализируемые образцы.....	23
9. Проведение анализа	27
10. Регистрация и интерпретация результатов	30
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	33
12. Утилизация	34
13. Гарантийные обязательства, контакты	35

Введение

Раннее диагностирование тяжелой острой респираторной инфекции (атипичной пневмонии), вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, крайне актуально для правильной и своевременной постановки диагноза и назначения лечения.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «Cito-CoV-2-Test», является специфичная часть геномной РНК штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса, фрагмент гена *N*, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида.

Материалом для проведения исследования служит клинический материал больного, взятый из верхних дыхательных путей (мазок из носоглотки, ротоглотки).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности РНК/ДНК) в отношении генома штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae к линии Beta-CoV В. Вирус отнесен ко II группе патогенности, как и некоторые другие представители этого семейства (вирус SARS-CoV, MERS-CoV), и предположительно является рекомбинантным вирусом между коронавирусом летучих мышей и неизвестным по происхождению коронавирусом¹.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Выявление РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР рекомендуется к применению у пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицами².

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по

^{1,3} Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)" (утв. Минздравом России)

назначению противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор биоматериала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводится пациентам с клинической симптоматикой респираторного заболевания, с подозрением на инфицирование вирусом SARS-CoV-2, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицами².

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Cito-CoV-2-Test» предназначен для качественного выявления специфической части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса – фрагмента гена *N*, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида, методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в клинических пробах (мазок из носоглотки, ротоглотки) с целью диагностики тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, у пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания, а также контактными лицами. Не требуется отдельного набора для выделения РНК, т.к. в состав набора входит ОТ-ПЦР-буфер, обеспечивающий лизис вирусных частиц и устойчивый к ингибиторам.

Функциональное назначение. Полученные результаты могут использоваться для поддержки диагностики тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник, лабораторный технолог.

В соответствии с п. 3.4. Методических рекомендаций МР 3.1.0170-20 «Эпидемиология и профилактика COVID-19»:

«Первичные скрининговые исследования без выделения могут проводиться на базе лабораторий, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных болезней III-IV групп патогенности, при этом к работе допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие подготовку/инструктаж по вопросам обеспечения требований биологической безопасности, проведенный сотрудниками организации и учреждении Роспотребнадзора, осуществляющих деятельность с возбудителями инфекционных болезней II группы патогенности (работа по проведению таких инструктажей организуется на территориальном уровне путем сбора обращений, формирования учебных групп при согласовании территориальных органов Роспотребнадзора)».

2. Принцип метода

Метод

Одностадийная обратная транскрипция – мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, не требующая процедуры выделения РНК (прямая ОТ-ПЦР-РВ)

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служит клинический материал больного, взятый из верхних дыхательных путей (мазок из носоглотки, ротоглотки).

Принцип определения

Выявление нуклеиновых частиц коронавируса SARS-CoV-2 основано на использовании метода реакции обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции в реальном времени в одной пробирке.

В состав ОТ-ПЦР буфера входят все основные реагенты, включая dNTP, генетически модифицированную ревертазу MMLV с подавленной активностью РНКазы H и повышенной термостабильностью, позволяющую увеличить выход кДНК, инактивированную антителами ДНК-полимеразу, не обладающую ферментативной активностью в условиях приготовления реакционной смеси и ревертирования, что приводит к повышению

специфичности и чувствительности, состав ОТ-ПЦР-буфера позволяет проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов, а также обеспечивает лизис вирусных частиц.

В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушителем, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения РНК фрагмента гена *N* коронавируса SARS-CoV-2 и внутреннего контрольного образца (далее ВКО): продукты амплификации гена *N* коронавируса SARS-CoV-2 регистрируются по каналу, соответствующему флуорофору FAM, продукты амплификации ВКО – по HEX.

ВКО позволяет оценить корректность прохождения ОТ-ПЦР и степень ингибирования реакции.

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе проведения реакции ОТ-ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истекшим сроком годности или условий хранения набора.

Нарушение условий хранения и транспортирования образцов.

Время проведения реакции ОТ-ПЦР составляет 1 ч 30 мин.

3. Состав набора реагентов

Формы комплектации

Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test» выпускается в одной форме комплектации.

Количество анализируемых проб

Каждый комплект реагентов «Cito-CoV-2-Test» рассчитан на проведение 96 реакций ОТ-ПЦР, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательного и положительного контрольных образцов или 32 единичных постановок исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора

Таблица 1 – Состав набора реагентов «Cito-CoV-2-Test»:

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 480 мкл
3	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
4	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
5	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 940 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

ОТ-ПЦР-буфер готов к использованию и содержит ревертазу с «теплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дНТФ и оптимизированный буфер, позволяющий проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов.

Праймер-микс готов к использованию и содержит мультимплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд, специфичные фрагменту гена *N*, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида – специфичной части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 коронавируса. Фрагмент гена *N*, применяемый в качестве мишени в данной тест-системе, рекомендован FDA для выявления коронавируса.¹ Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к внутреннему контрольному образцу. Детекция по каналу HEX.

Прохождение реакции по HEX позволяет оценить корректность прохождения ОТ-ПЦР в присутствии ингибиторов в пробе. При отсутствии реакции результат следует считать недостоверным, и в этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется провести повторный забор материала для проведения анализа.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой плазмидный вектор с синтетическими вставками ДНК, комплементарными РНК внутреннего контрольного образца и фрагмента гена *N* коронавируса (SARS-CoV-2).

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от РНКаз.

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой препарат НК.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 2. Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1) Внешний вид	
ОТ-ПЦР буфер	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с пунктом 1.4 ТУ 21.20.23-028-97638376-2020
1.3. Маркировка	В соответствии с пунктом 4 ТУ 21.20.23-028-97638376-2020
1.4. Упаковка	В соответствии с пунктом 5 ТУ 21.20.23-028-97638376-2020
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналу FAM $Ct \leq 30$ и по каналу HEX $Ct \leq 30$.
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM и HEX Ct не указан или >40
Прохождение реакции с ВКО+ОКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналу HEX $Ct \leq 30$ и отсутствии графика накопления флуоресценции по каналу FAM.
Прохождение реакции с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналам FAM и HEX во всех повторностях (не менее 6) $Ct \leq 40$ и при значении стандартного отклонения в повторях КОЧ не более 3%
Прохождение реакции с КОС	В пробирках с КОС по каналам FAM и HEX не указан.
Прохождение реакции с КОС+ВКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции по каналу HEX $Ct \leq 30$ и отсутствии графика накопления флуоресценции по каналу FAM.
Предел обнаружения	Прохождение реакции с SARS-CoV-2 в концентрации 500 копий на 1 мл биоматериала: регистрация роста сигнала флуоресценции по каналу FAM $Ct \leq 35$ и по каналу HEX $Ct \leq 30$.

Примечание: 1) для контроля предела обнаружения используют Панель инаktivированных возбудителей респираторных инфекций для исследования аналитической специфичности медицинских изделий для диагностики *in vitro*, Коронавирус SARS-CoV-2, штамм ГК2020/1, кат. № АА006, производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

2) при проведении контрольной ПЦР в качестве КОЧ и КОС используют:

- в качестве контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ) используют смесь плазмид с синтетическими вставками последовательностей, комплементарных мишеням коронавируса CoV-2 и внутреннего контрольного образца в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) с концентрацией 500 копий в 1 мл каждой;

- в качестве контрольного образца специфичности (КОС) используют раствор геномной ДНК человека, выделенный из клеточной линии *jurkat* с концентрацией 3 335 копий на 5 мкл (667 копий/мкл).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к фрагменту гена N, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида – специфичной части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 коронавируса.

4.2.1.1 Подтверждение специфичности *in silico*

Аналитическая специфичность целевого фрагмента гена N, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида SARS-CoV-2, подтверждалась *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.1.2 Подтверждение специфичности *in vitro* с помощью сертифицированных контрольных материалов

Для оценки возможности обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 использовали стандартный образец NIBSC:

- Международный стандарт ВОЗ Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/146.

Международный стандарт ВОЗ после восстановления был протестирован в двух дублях в каждом цикле анализа.

С помощью серии ПЦР-реакций проводили исследование Международного стандарта с помощью набора реагентов «Cito-CoV-2-Test».

Для проведения исследования использовали Амплификатор Rotor-Gene Q (QIAGEN), Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010.

По результатам исследования Международного стандарта ВОЗ «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146, подтверждена специфичность набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» по отношению к РНК штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса.

4.2.1.3 Аналитическая специфичность: оценка кросс-реактивности

Исследования по аналитической специфичности: оценки кросс-реактивности проводились при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов/штаммов:

– штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США):

Streptococcus pneumoniae (ATCC® 49619™),
Pseudomonas aeruginosa (ATCC® 9027™),
Mycoplasma pneumoniae, Strain PI 1428 (ATCC® 29085™),
Chlamydia pneumoniae, Strain CM-1 (ATCC® VR-1360™),
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila*, Strain Philadelphia 1 (ATCC® 33152™),

Staphylococcus epidermidis, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™),

Human Respiratory Syncytial Virus, Strain 9320 (ATCC® VR-955™),

Human Respiratory Syncytial Virus, Strain A-2 (ATCC® VR-1540™),

Human Parainfluenza Virus 1, Strain C35 (ATCC® VR-94™),
Human Parainfluenza Virus 2, Strain Greer (ATCC® VR-92™),
Human Parainfluenza Virus 3, Strain C243 (ATCC® VR-93™),
Human Rhinovirus 17, Strain 33342 (ATCC® VR-1663™),
Human Adenovirus 1, Strain Adenoid 71 (ATCC® VR-1™),
Human Coronavirus, Strain OC43 (ATCC® VR-1558™),
Human Coronavirus, Strain 229E (ATCC® VR-740™),
в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;

– штаммы из коллекции ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов):

Haemophilus influenzae 423,

Streptococcus pyogenes Dick – I,

Bordetella pertussis 703 L 6,

Mycobacterium Bovis Ravenel №700204

в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;

– штаммы из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева»:

А/Санкт-Петербург/НИИГ-252/19 (Influenza virus A (H3N2)),

А/Калининград/75/19 (Influenza virus A (H1N1)pdm09),

В/Washington/02/19 (Influenza virus В линия Виктория),

В/Якутск/НИИГ-06/2019 (Influenza virus В линия Ямагата) в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^7 ГЭ/мл.

Очищенная ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов была исследована с помощью набора реагентов «Cito-CoV-2-Test». По результатам исследования неспецифических реакций выявлено не было.

4.2.2 Аналитическая чувствительность: предел обнаружения (LOD)

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений Международных стандартов ВОЗ:

– **Международный стандарт ВОЗ Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/146.**

в диапазоне предполагаемого предела обнаружения в объеме 1 мл исследуемого биообразца: 100 копий/мл, 200 копий/мл, 300 копий/мл, 400 копий/мл, 450 копий/мл, 500 копий/мл, 550 копий/мл.

Каждое из 7 разведений анализировали с помощью набора «Cito-CoV-2-Test» в течение 3 разных дней в 30 повторях для расчета процента положительных результатов. Результаты определялись в соответствии с международными рекомендациями CLSI EP-17A2 пробит-анализом.

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «Cito-CoV-2-Test» были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

– Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

В соответствии с рекомендациями документа CLSI EP-17A2 с использованием пробит-анализа проводилась статистическая обработка полученных результатов. Для расчета предельной концентрации РНК коронавируса SARS-CoV-2 с доверительной вероятностью 95% использовалось пробит-значение (ось Y) 6,64 (1,64 для предела 95 %, +5 для пробит-шкалы).

По результатам исследования предел обнаружения РНК SARS-CoV-2 в биообразцах объемом 1 мл с частотой выявления 95 % для амплификатора ДТпрайм – 594 копий/мл (95%ДИ: 592,57-595,43), CFX 96 – 590 копий/мл (95%ДИ: 588,57-591,43), Rotor-Gene Q – 606 копий/мл (95%ДИ: 604,57-607,43), Quant Studio 5 – 594 копий/мл (95%ДИ: 592,57– 595,43).

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, внутренний контрольный образец по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%.

4.2.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости (раздел 4.2.3.), однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная,

межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 3%.

4.2.5 Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов – ПКО, КОЧ

Путем параллельного тестирования положительного контрольного образца ПКО и контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ) подтверждена их метрологическая прослеживаемость до Международного стандарта «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146.

На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ составляет ~ 500 копий/мл, ПКО ~ 200 000 копий/мл (200 копий/мкл). Неопределенность для ПКО составляет -0,02 log10 копий/мл, для КОЧ 0,02 log10 копий/мл.

4.3 Характеристики клинической эффективности

4.3.1 Изучение диагностических характеристик испытываемого набора

Для проведения клинических испытаний было использовано 125 клинических образцов мазков из верхних дыхательных путей от пациентов с подозрением на инфицирование коронавирусом SARS-CoV-2.

Для данных образцов клинического материала наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2 было установлено в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью зарегистрированного медицинского изделия «Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (SARS-CoV-2) методом ОТ-ПЦР в реальном времени «CoV-2-Тест» производства ООО «ТестГен», Россия, партия 202109-316, срок годности 2022-09 (№ РЗН 2020/10364 от 15.05.2020 г.).

В 65 предоставленных образцах у пациентов выявлено наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2 набором реагентов «CoV-2-Тест» и в 60 образцах – не обнаружено.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Cito-CoV-2-Тест», производства ООО «ТестГен» и набором сравнения «CoV-2-Тест», производства ООО «ТестГен», Россия.

Для проведения ПЦР-исследования были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

При тестировании 125 образцов - мазков из верхних дыхательных путей испытуемым набором реагентов в двух сериях (250 наблюдений) для всех четырех амплификаторов было определено, что 64 образца являются истинноположительными (в двух сериях - 128 наблюдений), 1 образец является ложноотрицательным (в двух сериях - 2 наблюдения) и 60 образцов являются истинноотрицательными (в двух сериях - 120 наблюдений) по содержанию РНК вируса SARS-CoV-2.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик будут рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986). Диагностические характеристики испытуемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Результаты изучения диагностических характеристик набора представлены в таблице 3.

Таблица 3

Вид исследуемого материала	Амплификатор	Число проб	Количество наблюдений	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазок из верхних дыхательных путей (носоглотки и ротоглотки)	ДТпрайм	125	250	98,4% (95% ДИ: 94,5%-99,8%)	100% (95% ДИ: 96,9%-100%)
	CFX 96	125	250	98,4% (95% ДИ: 94,5%-99,8%)	100% (95% ДИ: 96,9%-100%)
	Rotor-Gene Q	125	250	98,4% (95% ДИ: 94,5%-99,8%)	100% (95% ДИ: 96,9%-100%)
	QuantStudio 5	125	250	98,4% (95% ДИ: 94,5%-99,8%)	100% (95% ДИ: 96,9%-100%)

4.3.2 Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца биологическим агентом (муцин, гемоглобин) может ингибировать ПЦР.

Таблица 4. Анализ результатов проведенного исследования.

Интерферирующее вещество (Тип веществ)	Максимальная концентрация	Результат	
		Ложноположительные результаты	Ложноотрицательные результаты
Гемоглобин	10%	0/3	0/3
Муцин	5%	0/3	0/3
Ибупрофен	0,04 мг на мл	0/3	0/3
Амброксола гидрохлорид	0,003 мг на мл	0/3	0/3
Бромгексина гидрохлорид	0,016 мг в мл	0/3	0/3

Лопинавир	0,016 мг на мл	0/3	0/3
Ритонавир	0,004 мг на мл	0/3	0/3
Интерферон альфа	0,2 ед на мл	0/3	0/3
Парацетамол	0,065 мг на мл	0/3	0/3
Фенирамин малеат	0,04 мг на мл	0/3	0/3
Фенилэфрина гидрохлорид	0,002 мг на мл	0/3	0/3

На основании результатов клинических исследований, потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре забора биологического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» не оказывают влияние на результат анализа.

4.3.3 Оценка воспроизводимости и повторяемости медицинского изделия

4.3.3.1 Оценка повторяемости (внутри одной постановки) выполнена на трех положительных клинических образцах и одном отрицательном образце, в пяти повторях.

Для оценки повторяемости изделия использовались изделия из одной упаковки одной партии. Исследования проводил один и тот же оператор в одно и то же время.

Рассчитанный коэффициент вариации не превышает 3%.

4.3.3.2 Оценка воспроизводимости изделия (между сериями) и повторяемости (внутри одной постановки) проведена на 3х положительных клинических образцах и одном отрицательном образце, в пяти повторностях.

Рассчитанный коэффициент вариации не превышает 3%.

4.3.4 Исследование перекрестной реактивности

Перекрестная реактивность «Набора реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (SARS-CoV-2) методом прямой ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test», производства ООО «ТестГен», Россия была оценена согласно Инструкции производителя путем тестирования 25 образцов мазков из

ротоглотки, не содержащих РНК вируса SARS-CoV-2, от пациентов, у которых подтверждено наличие возбудителей респираторных инфекций: респираторно- синцитиальный вирус (РСВ) – 11 образцов, вирусы парагриппа – 4 образцов, риновирусы – 3 образца, аденовирусы – 5 образцов, человеческие метапневмовирусы – 2 образца.

Каждый из образцов тестировали в трех повторностях.

Результаты показали, что при испытании 25 образцов мазков из ротоглотки, не содержащих РНК вируса SARS-CoV-2, от пациентов, у которых подтверждено наличие возбудителей респираторных инфекций: респираторно- синцитиальный вирус (РСВ) – 11 образцов, вирусы парагриппа – 4 образцов, риновирусы – 3 образца, аденовирусы – 5 образцов, человеческие метапневмовирусы – 2 образца, перекрестной реактивности не наблюдалось.

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Cito-CoV-2-Test»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,
2. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемого образца содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР,
3. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации (невыполнение требований по предварительной инаktivации клинического материала);
4. использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (SARS-CoV-2) методом прямой ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3 – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

ВНИМАНИЕ! Клинический материал необходимо предварительно инактивировать путём прогрева при 70 °С в течение 5 минут в рабочей зоне ¹².

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «Cito-CoV-2-Test», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Cito-CoV-2-Test», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей настоящих методических рекомендаций.

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и

¹² Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)" (утв. Минздравом России)

медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II группы патогенности.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ).

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность коронавирусом SARS-CoV-2, проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СанПиН 3.3686-21), временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)», а также Информационного письма Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) от 21.01.2020 № 02/706-2020-27 "О направлении временных рекомендаций по организации лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)".

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб, помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным

объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;
2. не использовать набор по истечении срока годности;
3. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с комплектом реагентов для ОТ-ПЦР «Cito-CoV-2-Test» осуществляется в рабочей зоне 2 (для выделения НК) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения реакции ОТ-ПЦР:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от 2 °C до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.

5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM и HEX: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм», («ДНК-Технология», Россия) «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США).

2. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.

3. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

4. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

5. Для взятия мазка из носоглотки и ротоглотки рекомендуется использовать «Зонд медицинский одноразовый стерильный по ТУ 32.50.13-002-28731857-2020», производства ООО «ФармМедПолис

³ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Биологическим материалом для исследования является мазок из носоглотки и зева (ротоглотки).

ВНИМАНИЕ! В качестве пробирок с транспортной средой использовать ТОЛЬКО стерильные пробирки типа Эппендорф на 1,5-2,0 мл, содержащие 500 мкл стерильного физиологического раствора (или Фосфатного буферного (PBS) раствора). Использование транспортных сред с другим составом может привести к получению невалидного результата вследствие ингибирования реакции.

ВНИМАНИЕ! Использование центрифужных пробирок объемом 5-15 мл может привести к ложноположительным результатам вследствие контаминации при переносе клинического материала в пробирку для ОТ-ПЦР. При невозможности отказа от центрифужных пробирок объемом 5-15 мл рекомендуется предварительно перенести биоматериал в пробирку типа Эппендорф на 1,5-2,0 мл с использованием длинных наконечников на 1000 мкл, в дальнейшем вносить биоматериал в ОТ-ПЦР наконечником на 10-20 мкл из пробирки типа Эппендорф на 1,5-2,0 мл.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

8.1 Процедура получения биологического материала

ВНИМАНИЕ! Забор диагностического материала, его упаковка, маркировка и транспортировка осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранении и транспортировке согласно МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности" и Методическими рекомендациями Роспотребнадзора МР 3.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19".

Медицинский работник, выполняющий забор диагностического материала, его маркировку и упаковку, должен пройти инструктаж по санитарно-эпидемиологическим требованиям и правилам биологической безопасности при работе с пациентами,

потенциально инфицированными микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Мазок с носоглотки

Мазок из полости носа берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

Мазок из ротоглотки

Мазки берут сухими ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку типа Эппендорф с 500 мкл стерильного физиологического раствора или (или Фосфатного буферного (PBS) раствора) и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом внутри. Пробирку плотно закрывают крышкой.

ВНИМАНИЕ! Для повышения концентрации вируса носоглоточные и орофарингеальные мазки должны быть помещены в одну пробирку.

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

Температура при транспортировке должна быть +2° - +8 °С. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 5 дней при +2° - +8 °С, может быть больше при -20 °С или -70 °С.

Транспортировка герметично закрытых контейнеров с образцами в лабораторию осуществляется в специальных контейнерах/биксах. Направления и другая документация на бумажных носителях передается в отдельном полиэтиленовом пакете.

При необходимости пересылки образцов в лабораторию другого медицинского учреждения выполняются требования к пересылке инфекционных материалов II группы патогенности (СП

1.2.036-95 "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности").

Пробирки/контейнеры с образцами вместе с крышкой герметизируют различными пластификаторами (парафин, парафильм и др.); емкость маркируют. Образцы каждого пациента помещают в индивидуальный герметичный пакет с адсорбирующим материалом и дополнительно упаковывают в общий герметичный пакет.

Два или более образца одного пациента могут быть упакованы в один пластиковый пакет. Запрещается упаковывать образцы клинического материала от разных людей в одну упаковку.

Пакет с контейнерами помещают в герметично закрывающийся контейнер для транспортировки биологических материалов. Контейнер помещают в пенопластовый термоконтейнер с охлаждающими термоэлементами. Транспортный контейнер опечатывается и маркируется. В контейнер желательно поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение температуры от +2° до +8 °С.

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера.⁴

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца биологическим агентом (муцин, гемоглобин) может ингибировать ПЦР.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Cito-CoV-2-Test», приведены в таблице 5.

⁴ "Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022) " (утв. Минздравом России)

Таблица 5

Тип	Вещество	Активный компонент	Концентрация
Эндогенные	Биологические агенты	Муцин	2% мас/об
		гемоглобин	0,01% об/об
Экзогенные	Безрецептурные капли для носа	Фенилэфрин	15% об/об
	Безрецептурный гель для носа	Хлорид натрия	5% об/об
	Безрецептурный спрей для носа1	Кромолин	15% об/об
	Безрецептурный спрей для носа2	Оксиметазолин	15% об/об
	Безрецептурный спрей для носа3	Флуконазол	5% мас/об
	Леденец от боли в горле	Бензокаин, Ментол	0,15% мас/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа1	Гальфимия глаука, Сабадилла	20% об/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа2	Глюконат цинка	5% мас/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа3	Алкалол	10% об/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа4	Флутиказона пропионат	5% об/об
	Спрей от боли в горле с фенолом	Фенол	15% об/об
	Противовирусный лекарственный препарат	Тамифлю (фосфат осельтамивира)	0,5% об/об
	Антибиотик, мазь для носа	Мупироцин	0,25% об/об
	Антибактериальное, системное	Тобрамицин	0,0004% мас/об

На основании результатов исследования данные вещества не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

9. Проведение анализа

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Клинический материал необходимо предварительно инактивировать путём прогревания при 70 °С в течение 5 минут в рабочей зоне ⁵.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 4 непосредственно в ПЦР-пробирках перед проведением анализа.

9.1. Проведение ОТ-ПЦР

Подготовка компонентов набора для ОТ-ПЦР

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с подготовленным клиническим материалом, ОКО, ОТ-ПЦР-буфером, ВКО, Праймер-миксом и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10

раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,1-0,2 мл для проведения реакции ОТ-ПЦР из расчёта на количество исследуемых образцов, ПКО и ОКО.

Перед приготовлением реакций необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20-30 минут.

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!

Для проведения одной реакции необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер – 5 мкл,
2. Праймер-микс – 5 мкл,
3. Образец (ПКО, ОКО, клинический материал) – 5 мкл,
4. Внутренний контрольный образец – 10 мкл.

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 6 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1-0,2 мл для ОТ-ПЦР по одной для каждого исследуемого образца, одну пробирку для ПКО и одну пробирку для ОКО (таблица 6).

Таблица 6 – Пример расположения пробирок и внесения компонентов для проведения ПЦР

Компонент	Образец 1		Образец 2		Контроли	
	повторы ⁵		повторы ⁵		ПКО	ОКО
ОТ-ПЦР-буфер, мкл	5 ¹	5	5	5	5	5
Праймер-микс, мкл	5	5	5	5	5	5
Образец, мкл	5	5	5	5	-	-
ВКО, мкл	10	10	10	10		
ПКО, мкл	-	-	-	-	15	-
ОКО, мкл	-	-	-	-		15

2. Внести в каждую пробирку по 5 мкл ОТ-ПЦР-буфера.

3. Внести в каждую пробирку по 5 мкл Праймер-микса.

⁵ Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022) " (утв. Минздравом России)

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл образца. В пробирки для ПКО и ОКО образец не вносится.

5. Внести в соответствующие пробирки по 10 мкл ВКО. В пробирки для ПКО и ОКО – внутренний контрольный образец не вносится.

6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.

7. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО.

8. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ВКО.

9. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1-3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

11. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 7.

Таблица 7 – Протокол ОТ-ПЦР для комплекта реагентов «Cito-CoV-2-Test»

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	25:00		1
2	95	02:00		1
3	95	00:15		5
	64	00:20		
4	95	00:15		45
	64	00:20	FAM, HEX	

12. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

13. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM и HEX.

14. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

15. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят автоматически по завершению ОТ-ПЦР с помощью программного обеспечения используемого прибора. Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct ВКО (канал HEX) и Ct мишени коронавируса (канал FAM).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения Ct в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (таблица 8).

Таблица 8 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Канал детекции	
	FAM (коронавирус)	HEX (ВКО)
ОКО	Ct >40 или отсутствует	Ct >40 или отсутствует
ПКО	Ct ≤30	Ct ≤30

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принцип интерпретации результатов отражён в таблице 9 и выполняется в следующем порядке:

1. Определяют качество проведённого анализа по значению Ct для канала HEX, которое должно составлять не более 30.
2. Оценивают результат реакции по каналу FAM.

Таблица 9 – Принцип интерпретации результатов.

Значение порогового цикла (Ct) по каналам		Результат
FAM	HEX	
Отсутствует	Ct ≤30	РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена
Ct ≤35	не учитывается ⁶	РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена
Ct >35 или отсутствует	Ct >30 или отсутствует	Результат невалидный
Ct >35	Ct ≤30	Результат сомнительный

⁶ При высоких концентрациях РНК коронавируса SARS-CoV-2 выход по каналу HEX может происходить на поздних циклах или отсутствовать.

Принцип интерпретации результатов:

РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена «-», если Ct по каналу HEX не более 30, а по каналу FAM Ct не указан (график накопления флуоресценции отсутствует).

РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена «+», если Ct по каналу FAM не более 35. Результат по каналу HEX при этом не учитывается.

Результат анализа невалидный «?», если Ct по каналу FAM не указан (график накопления флуоресценции отсутствует) или более 35, и Ct по каналу HEX не указан (график накопления флуоресценции отсутствует) или более 30.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация РНК, высокая концентрация ингибиторов в клиническом образце; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ОТ-ПЦР и др.

Результат анализа сомнительный, если Ct по каналу FAM более 35, а Ct по каналу HEX не более 30.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата образец считать положительным.

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение всего срока годности набора. Допускается заморозка/оттаивание не более 5 раз. После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «Cito-CoV-2-Test» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test» транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение всего срока годности набора. Возможна транспортировка при температуре 4 °С до трёх суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Внимание! Разморозка хладоэлементов в процессе транспортирования не является признаком нарушения условий транспортирования, поскольку допускается транспортировка набора при температуре 4 °С до трёх суток.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении

всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре: от минус 16 до минус 24 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

12. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Используемая потребительская упаковка и пробирки с реагентами не связаны с биологическими жидкостями человека и в соответствии с классификацией медицинских отходов относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с ч. X, п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания

по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «Cito-CoV-2-Test» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

13. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Cito-CoV-2-Test» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81
E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	«Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i> »
ГОСТ Р 56894-2016	«Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i> »
ГОСТ ISO 13485-2017	«Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования»
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р 51088-2013	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ Р 51352-2013	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний.

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

