ТестГен
Генетика нового поколения

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
УО ООО «ТестГен»
_____ А.Н. Тороповский
«27» января 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

«Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и определения делеции DEL31-33 в гене N, характерной для варианта B. 1.1.529 Omicron, методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV- 2-dif-O», партия 202201-8»

КОПИЯ ВЕРНА
Директор

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Введение 3
1. **Назначение** 3
2. **Принцип метода** 4
3. **Состав набора реагентов** 5
4. **Характеристики набора реагентов** 7
5. **Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов** 12
6. **Меры предосторожности при работе с набором** 12
7. **Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов** 14
8. **Анализируемые образцы** 15
9. **Проведение анализа** 17
10. **Регистрация и интерпретация результатов** 22
11. **Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов** 24
12. **Утилизация** 25
13. **Гарантийные обязательства, контакты** 26
Приложение А 27

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Введение

Раннее диагностирование тяжелой острой респираторной инфекции (атипичной пневмонии), вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, а также выявление мутации Δ31–33 гена *N* вируса SARS-CoV-2, характерной для варианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron), актуально для правильной и своевременной постановки диагноза новой коронавирусной инфекции и назначения лечения, важно для мониторинга распространения варианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) и решения эпидемиологических задач.

Целевые аналиты:

- по каналу FAM – по отношению к характерным для B.1.1.529 (Omicron) мутациям Δ31–33 в гене N, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида – специфичной части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 коронавируса

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

Научная обоснованность целевого аналита заключается в его специфичности (уникальности последовательности РНК) в отношении генома коронавируса SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19), включая вариант B.1.1.529 (www.gisaid.org).

Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae к линии Beta-CoV B. 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 коронавирусом[1].

Для выявления SARS-CoV-2 используется высококонсервативный фрагмент гена *N* (ген нуклеокапсида). Дифференциация варианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) основывается на выявлении характерной мутации Δ31–33 гена *N*[2].

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика, инфекционная диагностика.

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, с дифференциацией варианта B.1.1.529 (Omicron), в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактным лицам[1].

Выявление мутации гена *N* вируса SARS-CoV-2 рекомендуется для изучения распространения варианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) и прогностической оценки тяжести заболевания и эффективности препаратов и вакцин[3,4]. Противопоказаний к применению нет.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «CoV-2-dif-O» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов CoV-2-dif-O», партия 202201-8 предназначен для качественного выявления РНК SARS-CoV-2 и определения делеции DEL 31-33 в гене N, характерной для варианта B.1.1.529 (Omicron), методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в клинических пробах с целью диагностики тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, у пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания и контактным лицам, а также для дифференциации и мониторинга распространения варианта B.1.1.529 (Omicron).

---

[1] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), Версия 13 (14.10.2021) (Министерство здравоохранения Российской Федерации).

[2] Implications of the emergence and spread of the SARS CoV 2 B.1.1. 529 variant of concern (Omicron) for the EU/EEA. Threat Assessment Brief. 26 November 2021. European Centre for Disease Prevention and Control.

[3] Update 70 – Update on SARS-CoV-2 variant of concern Omicron 14 December 2021 (https://www.who.int/publications/m/item/update-70-update-on-sars-cov-2-variant-of-concern-omicron)

[4] Заявление ВОЗ от 28 ноября 2021 г. «Обновленная информация о варианте «омикрон» (https://www.who.int/news/item/28-11-2021-update-on-omicron)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для поддержки диагностики тяжелой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, а также для дифференциации и мониторинга распространения варианта B.1.1.529 (Omicron).

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Одностадийная обратная транскрипция – мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Тип анализируемого образца

При использовании формы комплектации 1: Образцы РНК, выделенные из мазков из носоглотки и ротоглотки (зева)

При использовании форм комплектации 2: Мазок из носоглотки и ротоглотки (зева). Реагенты для экстракции РНК входят в состав набора.

При использовании формы комплектации 3: Клиническим материалом для исследования является непосредственно мазок из носоглотки и ротоглотки (зева) (процедуры выделения РНК не требуется).

Принцип определения

Качественное выявление вируса SARS-CoV-2 с дифференциацией варианта B.1.1.529 (Omicron) методом мультиплексной одностадийной реакции обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;
2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов.

Форма комплектации 2 дополнительно содержит этап экстракции РНК из клинических образцов.

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

В состав ОТ-ПЦР-буфера 5х входят все основные реагенты, включая ревертазу с «теплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер (в форме комплектации 3 смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов находится в составе праймер-микса).

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

Набор содержит реагенты для качественного мультиплексного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2, РНК варианта B.1.1.529 (Omicron) и фрагмента РНК внутреннего контрольного образца (далее ВКО): продукты амплификации гена *N* коронавируса варианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) регистрируются по каналу, соответствующему флуорофору FAM/Green, продукты амплификации ВКО – по HEX/Yellow, продукты амплификации фрагмента генома коронавируса любого варианта SARS-CoV-2 – по каналу ROX/Orange.

ВКО позволяет оценить возможное наличие ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам и/или эффективность выделения РНК.

Ограничения метода

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения РНК либо проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ. 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 оставляет от 80 до 100 минут в зависимости от используемой модели амплификатора (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «CoV-2-dif-O» выпускается в трех формах комплектации:

1) **Форма комплектации 1**

Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic».

2) **Форма комплектации 2**

Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic», комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW».

3) **Форма комплектации 3** – не требует процедуры выделения РНК из биологического материала (прямая ОТ-ПЦР-РВ)

Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Cito».

Количество анализируемых проб

Наборы реагентов каждой формы комплектации (таблицы 1–3) рассчитаны на 96 реакций, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 15 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Таблица 1 – Состав набора реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8, форма комплектации 1

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic»			
1.	ОТ-ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 225 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1500 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 940 мкл

Таблица 2 – Состав набора реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8, форма комплектации 2

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic»			
1.	ОТ-ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 225 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1500 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 940 мкл
Комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW»			
1.	Буфер для связывания	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, 48 мл

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic»			
2.	Магнитные частицы, МЧ	Коричневая суспензия	1 пробирка, 960 мкл
3.	Раствор для промывки	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, 68 мл
4.	Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон, 10 мл

Таблица 3 – Состав набора реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8, форма комплектации 3

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Cito»			
1.	ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком	1 пробирка, 480 мкл
3.	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 225 мкл
4.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 225 мкл
5.	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 940 мкл

Состав набора

В состав **ОТ-ПЦР-буфера 5x** входят все основные реагенты, включая ревертазу с «тёплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

В состав **ОТ-ПЦР-буфера-Cito 5x** входят генетически модифицированная ревертаза MMLV с подавленной активностью РНКазы H, инактивированная антителами ДНК-полимераза и буфер, позволяющий проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов.

Праймер-микс, готов к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней:

1. Праймеры и зонд к фрагменту гена *N*, содержащему мутацию Δ31–33 – специфичной части геномной РНК варианта SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron)[5,6]. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонд к внутреннему контрольному образцу. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

3. Праймеры и зонд к фрагменту специфичной части геномной РНК коронавируса SARS-CoV-2. Детектируется консервативный фрагмент генома коронавируса SARS-CoV-2 любых штаммов по каналу ROX/Orange.

Праймер-микс формы комплектации 3 дополнительно содержит дезоксинуклеотидтрифосфаты.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и содержит выявляемые набором реагентов специфические фрагменты генома коронавируса (SARS-CoV-2) и внутреннего контрольного образца.

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

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

Комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW» содержит буфер для связывания, суспензию с магнитными частицами, раствор для промывки и элюент. Все компоненты готовы к использованию.

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

[5] Implications of the emergence and spread of the SARS CoV 2 B.1.1. 529 variant of concern (Omicron) for the EU/EEA. Threat Assessment Brief. European Centre for Disease Prevention and Control. 26 November 2021.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Внимание! Для постановки реакций следует использовать реагенты только из идентичной формы комплектации.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 4 – Набор реагентов «CoV-2-dif-O», форма комплектации 1

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1. Внешний вид	
ОТ-ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	- Набор реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8, - Инструкция по применению – 1 шт., - Паспорт качества – 1 шт. на партию.
1.3. Маркировка	Маркировка согласно ГОСТ Р 51088-2013 (пункт 6.2), ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015, ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015. Графическое оформление маркировки производят по ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020. Этикетки из клеящей бумаги по ГОСТ 7625-86.
1.4. Упаковка	**Первичная упаковка** - объем микропробирок компонентов: ОТ-ПЦР-буфер 5х, Праймер-микс, ПКО – 0,5 мл, ОКО – 1,5 мл, ВКО – 1,5 мл. **Вторичная упаковка** - все микропробирки помещают в упаковочный пакет с защелкой из полимерной пленки и комбинированных материалов по ГОСТ 12302-2013 размером 120*170 мм. На пакет наклеивается этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625-86) с маркировкой.
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange с $Ct \leq 30$
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct>35$
Прохождение реакций с ОКО+ВКО	В пробирках с ОКО+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct>35$, а по каналу HEX/Yellow $Ct\leq32$.
Прохождение реакций с КОС+ВКО	В пробирках с КОС+ВКО по каналу FAM/Green значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct>35$, по каналу HEX/Yellow $Ct\leq32$, а по каналу ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует).
Прохождение реакций с КОЧ+ВКО	В пробирках с КОЧ+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange $Ct \leq 35$, по каналу HEX/Yellow $Ct\leq32$

Таблица 5 – Набор реагентов «CoV-2-dif-O», форма комплектации 2

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1. Внешний вид	
Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic»	
	етная жидкость

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5х	
Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW»	
Буфер для связывания	Прозрачная бесцветная жидкость
Магнитные частицы	Коричневая суспензия
Раствор для промывки	Прозрачная бесцветная жидкость
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	- Набор реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8, - Инструкция по применению – 1 шт., - Паспорт качества – 1 шт. на партию.
1.3. Маркировка	Маркировка согласно ГОСТ Р 51088-2013 (пункт 6.2), ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015, ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015. Графическое оформление маркировки производят по ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020. Этикетки из клеящей бумаги по ГОСТ 7625-86.
1.4. Упаковка	Первичная упаковка - объем микропробирок компонентов: ОТ-ПЦР-буфер 5х, Праймер-микс, ПКО – 0,5 мл, ОКО – 1,5 мл, ВКО – 1,5 мл. Вторичная упаковка - все микропробирки помещают в упаковочный пакет с защелкой из полимерной пленки и комбинированных материалов по ГОСТ 12302-2013 размером 120*170 мм. На пакет наклеивается этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625-86) с маркировкой.
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО (без выделения)	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange с $Ct \leq 30$
Положительный результат с $ПКО_{выд.}$ (с выделением)	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange с $Ct \leq 30$
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct>35$
Прохождение реакций с ОКО+ВКО	В пробирках с ОКО+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct>35$, а по каналу HEX/Yellow $Ct\leq32$.
Прохождение реакций с КОС+ВКО	В пробирках с КОС+ВКО по каналу FAM/Green значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или $Ct>35$, по каналу HEX/Yellow $Ct\leq32$, а по каналу ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует).
Прохождение реакций с КОЧ+ВКО	В пробирках с КОЧ+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange $Ct \leq 35$, по каналу HEX/Yellow $Ct\leq32$

Таблица 6 – Набор реагентов «CoV-2-dif-O», форма комплектации 3

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1. Внешний вид	
ОТ-ПЦР-буфер-Сito	Прозрачная бесцветная жидкость

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5x	
Праймер-микс	Прозрачная жидкость с возможным сиреневым оттенком
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	- Набор реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8, - Инструкция по применению – 1 шт., - Паспорт качества – 1 шт. на партию.
1.3. Маркировка	Маркировка согласно ГОСТ Р 51088-2013 (пункт 6.2), ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015, ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015. Графическое оформление маркировки производят по ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020. Этикетки из клеящей бумаги по ГОСТ 7625-86.
1.4. Упаковка	**Первичная упаковка** - объем микропробирок компонентов: ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5x, Праймер-микс, ПКО, ОКО – 0,5 мл, ВКО – 1,5 мл. **Вторичная упаковка** – все микропробирки помещают в упаковочный пакет с защелкой из полимерной пленки и комбинированных материалов по ГОСТ 12302-2013 размером 120*170 мм. На пакет наклеивается этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625-86) с маркировкой.
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange с $Ct \leq 30$
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или Ct>35
Прохождение реакций с ВКО	В пробирках с ОКО+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или Ct>35, а по каналу HEX/Yellow Ct≤32.
Прохождение реакций с КОС+ВКО	В пробирках с КОС+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange значение Ct не указано (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или Ct>35, по каналу HEX/Yellow Ct≤32.
Прохождение реакций с КОЧ+ВКО	В пробирках с КОЧ+ВКО по каналам FAM/Green и ROX/Orange $Ct \leq 35$, по каналу HEX/Yellow Ct≤32

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

- по каналу FAM – по отношению к характерным для B.1.1.529 (Omicron) мутациям Δ31–33 в гене N, кодирующего фосфопротеин нуклеокапсида – специфичной части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 коронавируса

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

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*).

В рамках проведения клинических испытаний показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце НК следующих организмов и вирусов: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы, MERS-CoV, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenza type B, Legionella pneumophila

4.2.2 Аналитическая чувствительность

Формы комплектации 1–2: не менее 500 копий РНК вируса SARS-CoV-2 на 1 мл клинического

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Формы комплектации 3: не менее 1 000 копий РНК вируса SARS-CoV-2 на 1 мл клинического материала.

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости контрольный образец Коронавируса SARS-CoV-2, штамм ГК2020/1, кат. № АА006, входящий в состав Панели инактивированных возбудителей респираторных инфекций для исследования аналитической специфичности медицинских изделий для диагностики in vitro, производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России тестировали в 10 повторах.

данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и 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 наборы из 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 внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 3%.

4.2.5 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8 было проверено в ходе проведения клинических испытаний в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре забора клинического материала в следующих концентрациях:

для форм комплектации 1–2:

- гемоглобин – 10%;
- гиалуроновая кислота – 5%;
- «Ибупрофен» – 0,04 мг/мл;
- «Амбробене» – 0,003 мг/мл;
- «Бромгексин» – 0,016 мг/мл;
- «Калетра» – 0,02 мг/мл;
- «Интерферон» – 0,2 ед./мл;
- Терафлю» – 0,071 мг/мл;

для формы комплектации 3:

- гемоглобин – 0,1%;
- гиалуроновая кислота – 1%;
- «Ибупрофен» – 0,04 мг/мл;
- «Амбробене» – 0,003 мг/мл;
- «Бромгексин» – 0,016 мг/мл;
- «Калетра» – 0,02 мг/мл;
- «Интерферон» – 0,2 ед./мл;
- Терафлю» – 0,071 мг/мл.

На основании результатов исследования потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре выделения РНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8 не оказывают влияние на результат анализа.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4.2 Характеристики клинической эффективности

Таблица 7. Диагностические характеристики «Набор реагентов для качественного выявления К коронавируса SARS-CoV-2 и определения делеции DEL31–33 в гене N, характерной для ианта B.1.1.529 Omicron, методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-2-dif-O», партия 202201-8» Форма мплектации 1 и МИ сравнения. Автоматизированное выделение РНК с использованием эцессора магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков Kingfisher Flex с мощью «Набора реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ' 21.20.23-013-97638376-2019», Форма комплектации 1 (РУ № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021).

Вид следуе-мого атериала	Амплифи-катор	Число проб	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазок из верхних ихательных путей носоглотки и ротоглотки)	ДТпрайм	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)
	CFX 96	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)
	Rotor-Gene Q	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)
	QuantStudio 5	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)

Таблица 8. Диагностические характеристики «Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и определения делеции DEL31–33 в гене N, характерной для варианта B.1.1.529 Omicron, методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-2-dif-O», партия 202201-8» Форма комплектации 1и МИ сравнения. Ручное выделение РНК с помощью «Набора реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019», Форма комплектации 1 (РУ № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021).

Вид исследуе-мого материала	Амплифи-катор	Число проб	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазок из верхних дыхательных путей (носоглотки и ротоглотки)	ДТпрайм	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)
	CFX 96	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)
	Rotor-Gene Q	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)
	QuantStudio 5	30	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 88,65%, 100,0%)

Таблица 9. Диагностические характеристики «Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и определения делеции DEL31–33 в гене N, характерной для варианта B.1.1.529 Omicron, методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-2-dif-O», партия 202201-8»Форма комплектации 2 и МИ сравнения. Ручное выделение РНК с помощью входящего в состав комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW».

Вид исследуе-мого материала	Амплифи-катор	Число проб	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазок из верхних	ДТпрайм	60	100% (95% ДИ: 93,98%,	100% (95% ДИ: 93,98%,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Вид следуемого материала	Амплификатор	Число проб	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
ательных путей оглотки и оглотки)			100,0%)	100,0%)
	CFX 96	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)
	Rotor-Gene Q	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)
	QuantStudio 5	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)

аблица 10. Диагностические характеристики «Набор реагентов для качественного выявления РНК оронавируса SARS-CoV-2 и определения делеции DEL31–33 в гене N, характерной для варианта .1.1.529 Omicron, методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-2-dif-O», партия 202201-8» Форма комплектации 3, з выделения РНК.

Вид исследуемого материала	Амплификатор	Число проб	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазок из верхних дыхательных путей (носоглотки и ротоглотки)	ДТпрайм	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)
	CFX 96	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)
	Rotor-Gene Q	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)
	QuantStudio 5	60	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)	100% (95% ДИ: 93,98%, 100,0%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Перекрестная контаминация образцов;
3. Загрязнение материалов ингибирующими веществами;
4. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой РНК содержимым из пробирок ПКО или продуктами ПЦР;
5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
6. 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 с дифференциацией варианта B.1.1.529 Omicron методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-2-dif-O» 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! При использовании Формы комплектации 3 клинический материал необходимо предварительно инактивировать путём прогревания при 70 °С в течение 5 минут в рабочей зоне 1[7].

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «CoV-2-dif-O», 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 «CoV-2-dif-O», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «CoV-2-dif-O», 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 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 СП 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) (СП 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,

[7] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной [illegible] 21)» (утв. Минздравом России)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 реагентов

Работа с набором реагентов «CoV-2-dif-O» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций), работа с комплектами наборов для экстракции РНК («НК-Экстра-SW») осуществляется в рабочей зоне 2 (для выделения НК) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения реакции экстракции РНК:

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. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл с ускорением не менее 10000 x g при проведении экстракции с использованием центрифугирования;
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл с возможностью нагрева не менее чем до 80°С;
5. Вакуумный аспиратор медицинский с колбой-ловушкой;
6. Дозаторы переменного объёма, механические или электронные;
7. Штатив для пробирок объёмом 1,5 мл;
8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл при проведении экстракции с использованием магнитного штатива;
9. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от +2 до +8 °С.

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», ООО «Биоком», Россия);
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма (например, Eppendorf, Германия);
4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше -16 °С;
5. Амплификатор[8] с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

[8] Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одиноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Axygen, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Axygen, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл (например, ООО «ИнтерЛабСервис», Россия);
7. 96-луночные глубокие планшеты объёмом 2200 мкл свободные от посторонней ДНК/РНК и ДНКаз/РНКаз,
8. 96-луночный низкий планшет объёмом 200 мкл свободные от посторонней ДНК/РНК и ДНКаз/РНКаз,
9. Гребёнка наконечников для магнитов DW для KingFisher 96,
10. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объёмом 15 мл, свободные от посторонней ДНК/РНК и ДНКаз/РНКаз,
12. Штативы для пробирок объёмом 15 мл и 1,5 мл и наконечников,
13. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5–2,0 мл,
14. Набор для выделения РНК (при использовании формы комплектации 1 «CoV-2-dif-O-Classic»), см. п. 9.1.
15. При использовании формы комплектации 3 («CoV-2-dif-O-Cito») в качестве пробирок с транспортной средой для забора клинического материала использовать ТОЛЬКО стерильные пробирки типа Эппендорф на 1,5–2,0 мл, содержащие 500 мкл стерильного физиологического раствора (или Фосфатного буферного (PBS) раствора) или Систему транспортную ГЕМ со средой для вирусов по ТУ 20.59.52-029-17547866-2020, в варианте исполнения «Система транспортная ГЕМ со средой для вирусов модифицированной с универсальным и назофарингеальным зонд-тампонами с принадлежностями, партия 0033», производства ООО «ГЕМ», РУ № РЗН 2020/12263 от 13.10.2020.

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

При использовании формы комплектации 1: Образцы РНК, выделенные из мазков из носоглотки и ротоглотки (зева).

При использовании формы комплектации 2: Мазок из носоглотки и ротоглотки (зева). Реагенты для экстракции РНК входит в состав набора.

При использовании формы комплектации 3: Клиническим материалом для исследования является непосредственно мазок из носоглотки и ротоглотки (зева) (процедуры выделения РНК не требуется).

ВНИМАНИЕ! При использовании формы комплектации 3 («CoV-2-dif-O-Cito») в качестве пробирок с транспортной средой для забора клинического материала использовать ТОЛЬКО стерильные пробирки типа Эппендорф на 1,5–2,0 мл, содержащие 500 мкл стерильного физиологического раствора (или Фосфатного буферного (PBS) раствора) или Систему транспортную ГЕМ со средой для вирусов по ТУ 20.59.52-029-17547866-2020, в варианте исполнения «Система транспортная ГЕМ со средой для вирусов модифицированной с универсальным и назофарингеальным зонд-тампонами с принадлежностями, партия 0033», производства ООО «ГЕМ», РУ № РЗН 2020/12263 от 13.10.2020. Использование транспортных сред с другим составом может привести к получению невалидного результата вследствие ингибирования реакции.

ВНИМАНИЕ! Использование центрифужных пробирок объёмом 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 объёмом 5–15 мл перенести биоматериал в пробирку типа Эппендорф на 1,5–2,0 мл с

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 клинического 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 транспортировки 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 одиоразовую 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.

Условия транспортирования и хранения клинического материала:

- при температуре от +18°С до +22°С в течение 6 часов;
- при температуре от +2°С до +8°С – в течение 3 суток;
- при температуре -20°С – в течение 1 недели;
- при температуре -70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера.[9]

8.2. Подготовка клинического материала[10]

Мазок с носоглотки и зева (ротоглотки)

– Перенесите соскоб эпителиальных клеток с помощью одноразового зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой (или 500 мкл физиологического раствора стерильного), аккуратно перемешайте.

– Извлеките зонд, прижимая его к стенке пробирки и отжимая избыток жидкости. Пробирку плотно закройте.

– Центрифугируйте пробирку при 13 000 об./мин. в течение 10 мин.

– Удалите супернатант (надосадочную жидкость), оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «CoV-2-dif-O» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре забора клинического материала в следующих концентрациях:

для форм комплектации 1–2:

– гемоглобин – 10%;
– гиалуроновая кислота – 5%;
– «Ибупрофен» – 0,04 мг/мл;
– «Амбробене» – 0,003 мг/мл;
– «Бромгексин» – 0,016 мг/мл;
– «Калетра» – 0,02 мг/мл;
– «Интерферон» – 0,2 ед./мл;
– Терафлю» – 0,071 мг/мл;

для формы комплектации 3:

– гемоглобин – 0,1%;
– гиалуроновая кислота – 1%;
– «Ибупрофен» – 0,04 мг/мл;
– «Амбробене» – 0,003 мг/мл;
– «Бромгексин» – 0,016 мг/мл;
– «Калетра» – 0,02 мг/мл;
– «Интерферон» – 0,2 ед./мл;
– Терафлю» – 0,071 мг/мл.

На основании результатов исследования потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре выделения РНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «CoV-2-dif-O», не оказывают влияние на результат анализа.

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 «DNase-free» и «RNase-

[9] "Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 14 (27.12.2021)" (утв. Минздравом России)

[10] МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности». М.: 2009 г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

fee». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

9.1. Выделение РНК из клинического материала

9.1.1. При использовании формы комплектации 1 «CoV-2-dif-O-Classic»

Рекомендуется использование следующих комплектов для экстракции:

– набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019 производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение: РЗН 2021/15428 от 24.09.2021)

Во время процедуры выделения РНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Образец ОКО также проходит процедуру выделения РНК в объёме 100 мкл без добавления ВКО. Если инструкцией производителя для выделения РНК предусмотрено использование большего объёма образца, следует довести объём ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых препаратов РНК: согласно инструкции используемого набора для выделения.

9.1.2. При использовании формы комплектации 2. Состав: комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic», комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW».

ВНИМАНИЕ! Расслоение или выпадение осадка не влияет на качество растворов. Если образовался осадок или расслоение компонентов одного из флаконов, необходимо прогреть его при +70°С и тщательно перемешать до полного растворения осадка и гомогенизации растворов.

Перед началом работы и перед каждой манипуляцией с раствором магнитных частиц его следует полностью ресуспендировать на вортексе или пипетированием, так как суспензия магнитных частиц является двухфазной, легко и быстро образует чётко разделяемые фазы.

Все компоненты набора перед началом работы необходимо тщательно перемешать.

При большом количестве анализируемых проб допускается перед работой перенести всё содержимое пробирки с «Магнитными частицами» (960 мкл) во флакон с «Буфером для связывания». Данная смесь может храниться в течение 7 суток. Следует тщательно перемешивать приготовленную суспензию магнитных частиц в «Буфере для связывания» перед каждым использованием.

9.1.2.1. Процедура выделения РНК комплектом реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW» с использованием магнитного штатива

Для каждого исследуемого образца приготовить и промаркировать по одной пробирке объёмом 1,5–2,0 мл.

1. Добавить в каждую пробирку по 500 мкл буфера для связывания, 10 мкл раствора магнитных частиц и 10 мкл раствора ВКО (если он предусмотрен для данного анализа). В случае предварительного смешивания магнитных частиц с буфером для связывания, следует перенести в каждую пробирку по 510 мкл смеси буфера для связывания с магнитными частицами и 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для данного анализа).

2. Внести по 100 мкл образца клинического материала в каждую пробирку, перемешать на вортексе 3–5 секунд.

3. Для лизиса инкубировать пробирки при +70°С в течение 5 минут, перемешивая раствор через каждые 2 минуты на вортексе.

4. По завершении лизиса перенести пробирки в лабораторный штатив и инкубировать смесь для связывания РНК при комнатной температуре в течение 10 минут, перемешивая раствор во время инкубации через каждые 3 минуты путем переворачивания пробирок.

5. По завершении инкубации сбросить капли коротким центрифугированием, затем поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок (обычно требуется 1–2 минуты) и тщательно удалить супернатант с помощью дозатора или аспиратора.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6. Внести в пробирки по 700 мкл раствора для промывки, плотно закрыть крышки, ресуспендировать магнитные частицы на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

7. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок и тщательно удалить супернатант.

ВНИМАНИЕ! Остаточные количества супернатанта в пробирках при выполнении этапов 5 и 7 могут негативно влиять на ПЦР. Необходимо производить тщательное удаление супернатанта.

8. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат и инкубировать при +70°С в течение 5 минут для просушки магнитных частиц и удаления остаточного спирта.

9. Внести в пробирки по 50 мкл элюента, используя отдельный наконечник с фильтром. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием, плотно закрыть крышки.

10. Инкубировать пробирки при +70°С в течение 10 минут. Во время инкубации 2–3 раза перемешать содержимое пробпрок путем осторожного взбалтывания осадка.

11. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок.

12. Перенести супернатант, содержащий выделенную РНК, в новые пробирки. ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной РНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

9.1.2.2. Процедура выделения РНК комплектом реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW» с использованием центрифуги.

Для каждого исследуемого образца приготовить и промаркировать по одной пробирке объемом 1,5–2,0 мл.

1. Добавить в каждую пробирку по 500 мкл буфера для связывания, 10 мкл раствора магнитных частиц и раствор ВКО (если он предусмотрен для данного анализа). В случае предварительного смешивания магнитных частиц с буфером для связывания, следует перенести в каждую пробирку по 510 мкл смеси буфера для связывания с магнитными частицами и раствор ВКО (если он предусмотрен для данного анализа).
2. Внести по 100 мкл образца клинического материала в каждую пробирку, перемешать на вортексе 3–5 секунд.
3. Для лизиса инкубировать пробирки при 70°С в течение 5 минут, перемешивая раствор через каждые 2 минуты на вортексе.
4. По завершении лизиса перенести пробирки в лабораторный штатив и инкубировать смесь для связывания РНК при комнатной температуре в течение 10 минут, перемешивая раствор во время инкубации через каждые 3 минуты путем переворачивания пробпрок.
5. По завершении инкубации центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 минуты.
6. Осторожно, не задевая осадок по внутренней стенке пробирки отобрать надосадочную жидкость с помощью дозатора или аспиратора, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Внести в пробирки по 700 мкл раствора для промывки, плотно закрыть крышки, перемешать магнитные частицы на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.
8. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 минуты.
9. Осторожно отобрать надосадочную жидкость аналогично пункту 6.
10. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат и инкубировать при +70°С в течение 5 минут для просушки магнитных частиц.
11. Внести в пробирки по 50 мкл элюента, используя отдельный наконечник с фильтром. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием, плотно закрыть крышки.
12. Инкубировать пробирки при +70°С в течение 10 минут. Во время инкубации 2–3 раза перемешать содержимое пробирок вручную путем осторожного взбалтывания осадка.
13. Центрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 минуты.
14. С помощью дозатора осторожно, не задевая осадка наконечником, перенести надосадочную жидкость, содержащую выделенную РНК, в новые пробирки.

ВНИМАНИЕ! Если в течение 3 минут после центрифугирования проба не перенесена в отдельную пробирку, необходимо провести повторное центрифугирование.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

При необходимости комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW» может быть адаптирован для использования на автоматических станциях для выделения нуклеиновых кислот Tecan серии Freedom EVO® (TECAN, Швейцария, Австрия) и KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific, Финляндия)).

9.2. Проведение ОТ-ПЦР

9.2.1. Проведение ОТ-ПЦР для форм комплектации 1 и 2 «CoV-2-dif-O-Classic»

Подготовка компонентов набора для ОТ-ПЦР

Перед приготовлением реакционных смесей 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.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером 5х, Праймер-миксом, ОКО, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: количество исследуемых образцов + ПКО + ОКО.

Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер 5х – 5 мкл,
2. Праймер-микс – 5 мкл,
3. Образец (исследуемый образец РНК, ПКО, ОКО) – 15 мкл.

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакций.

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 11 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: (n+3)x5 мкл ПЦР-буфера и (n+3)x5 мкл праймер-микса, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
3. В соответствующие приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси.
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.
6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО, прошедшего этап выделения НК.
7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.
8. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
9. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора (таблица 12)

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (возможна регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае $\Delta Rn > 100\ 000$, что может привести к получению ложноположительных результатов)! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 12 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	25:00	□	□
2	95	02:00	□	□
3	95	00:15	□	5
	64	00:20		
4	95	00:15	□	40
	64	00:20	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange	

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

10. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange.

11. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

12. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

9.2.2. Проведение ОТ-ПЦР для формы комплектации 3 «CoV-2-dif-O-Cito»

ВНИМАНИЕ! Клинический материал необходимо предварительно инактивировать путём прогревания при 70 °С в течение 5 минут в рабочей зоне 1[11].

Подготовка компонентов набора для ОТ-ПЦР

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с подготовленным клиническим материалом, ОКО, ОТ-ПЦР-буфером-Cito, ВКО, Праймер-миксом и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, 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.

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

Для проведения одной реакции необходимо:

Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер-Cito 5х – 5 мкл,
2. Праймер-микс – 5 мкл,
3. Образец (исследуемый образец – 5 мкл с добавлением 10 мкл ВКО, образец ПКО или образец ОКО) – 15 мкл.
4. **Общий объём реакции – 25 мкл.**

Протокол проведения ОТ-ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 11 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1–0,2 мл для ОТ-ПЦР по одной для каждого исследуемого образца[12], одну пробирку для ПКО и одну пробирку для ОКО.

[11] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), Версия 13 (14.10.2021) (Министерство здравоохранения Российской Федерации).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU [12] Целесообразно анализировать каждый образец в двух повторах.

Таблица 11– Пример расположения пробирок и внесения компонентов для проведения ПЦР

Компонент	Образец 1		Образец 2		Контроли	
	повторы		повторы		ПКО	ОКО
ОТ-ПЦР-буфер-Cito, мкл	5	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-Cito.

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

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

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

10. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 13.

Таблица 13 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	25:00	□	□
2	95	02:00	□	□
3	95	00:15	□	5
	64	00:20		
4	95	00:15	□	40
	64	00:20	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange	

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

11. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange.

12. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

13. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ОТ-ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 15–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange. Учитываются только значения Ct, полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. таблицу 14).

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% для каналов Green и Yellow и 5% для канала Orange в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

10.1. Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО должны быть получены следующие результаты (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам, для всех реакционных смесей		
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange
ОКО	> 35 или отс.	> 35 или отс.	> 35 или отс.
ПКО	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30

Обозначения: «отс.» – значение Ct отсутствует.

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 14, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 14, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 14, необходимо заменить реагенты.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10.2. Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принципы интерпретации результатов представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов

Значение порогового цикла (Ct) по каналам			Результат
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	
отс.	Ct ≤ 32	отс.	РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена
Ct ≤ 35	не уч.[13]	не уч.[14]	**Обнаружена РНК коронавируса с мутацией Δ31–33 в гене *N* SARS-CoV-2, характерную для B.1.1.529 (Omicron)**
отс.	не уч.[11]	Ct ≤ 35	**Обнаружена РНК коронавируса, не содержащая мутацию Δ31–33 в гене *N*, характерную для B.1.1.529 (Omicron) (варианты вируса SARS-CoV-2 с нормальным вариантом гена *N*, кодирующим фосфопротеин нуклеокапсида – специфичной части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 коронавируса, например, варианты вируса SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta), B.1.617.2.1 (Delta plus))**
Ct > 35 или отс.	Ct > 32 или отс.	Ct > 35 или отс.	Результат невалидный
Ct > 35	не уч.[11]	Ct ≤ 35	Результат сомнительный
Ct > 35	Ct ≤ 32	Ct > 35 или отс.	
Ct > 35 или отс.		Ct > 35	

Обозначения: «отс.» – значение Ct отсутствует; «не уч.» – значение Ct не учитывается при интерпретации.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация НК, присутствие ингибиторов в препарате НК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ОТ-ПЦР, наличие дополнительных мутаций в геномной РНК вируса SARS-CoV-2, приходящихся на область гибридизации праймеров и зондов, и др.

В случае невалидного или сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ. При этом рекомендуется проведение выделения НК из большего объёма клинического материала. При повторении невалидного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic» (форма комплектации 1, 2) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Cito» (форма комплектации 3), входящие в состав набора «CoV-2-dif-O» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от -18 °С до -22 °С в

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

[14] **ВНИМАНИЕ!** При получении для образца по каналу ROX Ct < 15 (при высокой концентрации РНК SARS-CoV-2) возможен неспецифический рост флуоресцентного сигнала по каналу FAM. В случае если для канала ROX Ct < 15, а для канала FAM Ct > 20, рекомендуется повторить анализ, разбавив образец деионизованной, свободной от нуклеаз водой в 100 раз.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ечение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от +2 °С до +6 °С до 30 уток. Допускается заморозка/оттаивание набора не более 10 раз.

Комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW» (форма комплектации 2), входящий состав набора «CoV-2-dif-O» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от +2 С до +30 °С. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

Рекомендуемые условия хранения верифицированы с использованием технологии «ускоренного старения».

Транспортирование

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

Комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Classic» (форма комплектации 1, 2) и комплект реагентов для ОТ-ПЦР «CoV-2-dif-O-Cito» (форма комплектации 3), входящие в состав набора «CoV-2-dif-O» транспортировать при температуре от -18 °С до -22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от +2 °С до +6 °С до 30 суток, или при температуре окружающей среды, но не выше +25 °С не более 2 суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как 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.

Комплект реагентов для экстракции РНК «НК-Экстра-SW» (форма комплектации 2), входящий в состав набора «CoV-2-dif-O» транспортировать при температуре от +2 °С до +30 °С. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

Рекомендуемые условия транспортирования верифицированы с использованием технологии «ускоренного старения».

Срок годности

Данные о сроке годности верифицированы с использованием технологии «ускоренного старения».

Срок годности набора реагентов «CoV-2-dif-O» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при температуре от -18 °С до -22 °С, соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 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 приготовленных для работы компонентов набора

Один 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».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113).

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 «CoV-2-dif-O» 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 качество и безопасность набора реагентов «CoV-2-dif-O», партия 202201-8 в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил 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, 44-й Инженерный 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ 15.309-98	Системы разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения
ГОСТ Р 51088-2013	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия.
ГОСТ Р 51352-2013	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
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 ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования

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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В настоящем документе прошито и пронумеровано
27 (двадцать семь) лист 06
Директор ГБУЗ «ДЦЛИ ДЗМ» А.Г.Комаров
«23» января 2023 года

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU