

Организация-производитель

Место производства

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»


С.А. Самарин
«03» марта 2022 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»


С.П. Деничев
«03» марта 2022 г.**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ****Набор реагентов****для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2****методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени****(SARS-CoV-2 Лайт)**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV-2	- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус вызывающий острый респираторный синдром 2)
COVID-19	- COrona VIRus Disease 2019, коронавирусное заболевание 2019
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1 Полное наименование набора реагентов:** Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (SARS-CoV-2 Лайт), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2 Назначение:** Набор реагентов предназначен для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- 1.3 Функциональное назначение:** диагностика *in vitro*.
- 1.4 Показания к проведению исследования:**
- лица с симптомами ОРВИ и контактировавшие с заболевшим COVID-19, независимо от их возраста;
 - лица всех возрастов без признаков ОРВИ (в очагах инфекции/ в условиях распространения инфекции) с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.
- 1.5 Демографические и популяционные аспекты:** применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.6 Область применения:** Набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике, безопасность работы лабораторий должна быть обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.
- 1.7* Потенциальные пользователи:** квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.**

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R3-P446-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 25 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,62 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	110 мкл
Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	110 мкл
Положительный контрольный образец (К+)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.2 Количество анализируемых образцов

96 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: обратная транскрипция РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В наборе реагентов используется технология «прямой ОТ-ПЦР»: выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводят без этапа выделения РНК из клинических образцов.

Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК проводят в одной пробирке.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной

смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав набора реагентов включен внутренний контрольный образец (РНК-ВК), который предназначен для оценки качества прохождения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой кДНК коронавируса SARS-CoV-2 (гены E, RdRP), включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта внутреннего контрольного образца, включена флуоресцентная метка Hex.

2.4 **Время проведения анализа: от 1,5 часов.**

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта по каналу детекции Fam.

В образцах биологического материала человека, не содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат амплификации внутреннего контроля по каналу Hcx и отрицательный результат амплификации специфического продукта по каналу Fam.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК Human Coronavirus HKU-1, Human Coronavirus NL-63, Human Coronavirus 229E, Human Coronavirus OC-43, Human Rhinovirus, Human Respiratory syncytial virus A, B, Human Parainfluenza virus type 1, Human Parainfluenza virus type 2, Human Parainfluenza virus type 3, Human Parainfluenza virus type 4, Human Metapneumovirus, MERS-CoV, ДНК Human Adenovirus, MRSA, *Legionella pneumophila*, ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, а также ДНК человека в концентрации до 10^8 копий/мл образца.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

К интерферирующим веществам, которые могут присутствовать в образце биологического материала, отнесены следующие эндогенные и экзогенные интерферирующие вещества: цельная кровь, слизь (муцин) и местные лекарственные препараты.

Цельная кровь в концентрации выше 5% v/v, гуанидина изотиоцианат в концентрации выше 1 % v/v оказывают влияния на результаты исследования.

Слизь (муцин) в концентрации до 10% мг/мл не оказали влияния на результаты исследования.

Хлоргексидина биглюконат 0.05%, Тантум Верде (бензидамина гидрохлорид), Тизин (ксилометазолин), Гриппферон (интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный) в концентрации 5% v/v не оказали влияния на результаты исследования.

Гексорал (гексэтидин) в концентрации выше 0% оказывает влияние на результаты исследования.

Для снижения количества интерферирующих веществ, ингибирующих ПЦР, необходимо исключить применение местных лекарственных препаратов за 6-12 часов перед взятием биологического материала, соблюдать правила его взятия, транспортировки и хранения. Перед взятием биологического материала не рекомендуется проведение гигиенических процедур носоглотки и ротоглотки (в том числе использование зубной пасты и ополаскивателей).

ВНИМАНИЕ! Не допускается использовать транспортные среды, содержащие соли гуанидина.

При работе с набором реагентов «SARS-CoV-2 Лайт» рекомендуется использовать транспортную среду («Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, № РЗН 2020/9640; «Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор) по ТУ 9398-550-23548172-2016», АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Россия, РУ № РЗН 2017/6004) или стерильный физиологический раствор хлорида натрия.

При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется использовать методы, включающие этап выделения нуклеиновых кислот.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения: 10^3 геном-эквивалентов на 1,0 мл анализируемого образца (мазок из носоглотки, ротоглотки в транспортной среде).

3.4 Диагностические характеристики

Количество исследований (n) – 260.

Диагностическая чувствительность (95% ДИ) – 100 % (94,87-100,00);

Диагностическая специфичность (95% ДИ) – 100 % (98,08-100,00).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Коронавирус SARS-CoV-2 отнесен ко II группе патогенности. Класс потенциального риска применения набора реагентов: 3 (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 N 4н).

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 обязаны обеспечивать безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Согласно МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19»:

Организация лабораторной диагностики COVID-19 осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с микроорганизмами II групп патогенности.

К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей методических рекомендаций МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19».

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

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).

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Подготовку к ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы, используемые при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 15-30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса ,B, которые утилизируются 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасных компонентов	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	
ОТ-ПЦР-буфер		
Фермент Taq/RT		
Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	Азид натрия менее 0,1%	является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец (К+)		

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Применять набор реагентов строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов SARS-CoV-2 Лайт требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II-III класса;
- детектирующий амплификатор планшетного типа: «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология») или CFX96 (Bio-Rad);
- микроцентрифуга-вортекс с ротором для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- холодильник с морозильной камерой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда («Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, № РЗН 2020/9640; «Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор) по ТУ 9398-550-23548172-2016», АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Россия, РУ № РЗН 2017/6004) или стерильный физиологический раствор хлорида натрия.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки из носоглотки и ротоглотки, взятые в стерильный физиологический раствор хлорида натрия или транспортную среду, зарегистрированную в РФ в установленном порядке (см. таблицу 1)

Таблица 1 – Транспортные среды, валидированные для использования совместно с набором реагентов SARS-CoV-2 Лайт

Медицинское изделие, РУ	Комплектация	Биоматериал
Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23.110-101-46482062-2018 ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640 от 14.02.2020	Фасовка S, пробирки Фасовка N	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор) по ТУ 9398-550-23548172-2016 АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Россия, РЗН 2017/6004 от 24.07.2017	«Транспортный раствор (1)» «Транспортный раствор (2)»	Мазки из носоглотки, ротоглотки

6.2 Особенности взятия биоматериала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19" от 30.03.2020

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

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19"

Таблица 2 – Условия транспортирования и хранения биоматериала

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспортирование	Условия хранения до тестирования	Комментарии
Мазок из носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков**	4 °C	≤5 дней: 4 °C >5 дней*: -70 °C	Носоглоточные и орофарингеальные тампоны должны быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки

* при невозможности обеспечить хранение при минус 70 °C, образцы хранить при минус 20 °C.

**для транспортировки образцов используют транспортную среду для хранения и транспортировки респираторных мазков или физиологический раствор (при условии транспортировки до тестирования не более 24 часов после взятия образца).

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Рекомендуется перед проведением анализа центрифугировать пробирку с биоматериалом в транспортной среде при 12000 - 16000 x g в течение 1 мин

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Меры по предупреждению кросс-контаминации биоматериалом

ВНИМАНИЕ! Диапазон вирусной нагрузки SARS-CoV-2 может варьировать в широких пределах от очень низких значений (10^4 и менее копий/мл) в биоматериале от лиц с бессимптомным носительством и лиц на стадии выздоровления до крайне высоких значений (более 10^9 копий/мл) в биоматериале от пациентов с клинической картиной острой вирусной пневмонии. В связи с этим при выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации биоматериалом в лаборатории рекомендуется выполнение следующих правил:

1. Необходимо проводить визуальную оценку поступившего биоматериала и выбраковку всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.
2. По возможности выделять в отдельный поток образцы от пациентов из стационара с симптомами острой инфекции и анализировать их отдельно от остальных образцов (биоматериал для скрининга контактировавших лиц и пациентов с легким течением заболевания). Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательно выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.
3. Обязательно выполнять постановку отрицательных контрольных образцов в каждом протоколе.
4. Использовать на всех этапах исследования наконечники с аэрозольными фильтрами.
5. Четко соблюдать методику выполнения исследования, открывать пробирки типа Эппендорф при помощи пинцета (не допускать касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки); при внесении реагентов не касаться наконечником пробирки (если это произошло, сразу заменить наконечник).

В наборе реагентов используется технология «прямой ОТ-ПЦР»: выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводят без этапа выделения РНК из клинических образцов.

Для снижения количества интерферирующих веществ, в том числе ингибирующих ПЦР, необходимо не применять местные лекарственные препараты перед взятием биологического материала, соблюдать правила его взятия, транспортировки и хранения. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется использовать методы, которые включают этап выделения нуклеиновых кислот.

7.2 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР необходимо провести **СРАЗУ** после приготовления реакционных смесей с внесёнными образцами биоматериал. Не допускается хранение подготовленных пробирок с реакционной смесью до проведения исследования.

7.2.1 Промаркируйте по одной стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К-).

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку для «К+» и одну пробирку для «К-». Общее количество пробирок – 8.

7.2.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер», «Фермент Taq/RT», «РНК-ВК» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера, фермента Taq/RT и внутреннего контрольного образца (РНК-ВК).

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 15 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 1,0 x (N+1) мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК);

– 1,0 x (N+1) мкл фермента Taq/RT.

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «К+» и «К-».

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT и внутренним контрольным образцом РНК-ВК для 9 (8+1) пробирок, т.е. 135 мкл ОТ-ПЦР-буфера + 9,0 мкл внутреннего контрольного образца РНК-ВК + 9,0 мкл фермента Taq/RT.

Таблица 3 – Расчёт количества реагентов для приготовления реакционной смеси

Количество клинических образцов в постановке	Количество промаркированных пробирок, с учётом К+ и К-	Объём реагентов для приготовления реакционной смеси			Общий объём реакционной смеси, мкл
		ОТ-ПЦР-буфер, мкл	РНК-ВК, мкл	Taq/RT, мкл	
6	8 (1 стрип)	135	9	9	153
14	16 (2 стрипа)	255	17	17	289
22	24 (3 стрипа)	375	25	25	425
30	32 (4 стрипа)	495	33	33	561
38	40 (5 стрипов)	615	41	41	697
46	48 (6 стрипов)	735	49	49	833
54	56 (7 стрипов)	855	57	57	969
62	64 (8 стрипов)	975	65	65	1105
70	72 (9 стрипов)	1095	73	73	1241
78	80 (10 стрипов)	1215	81	81	1377
86	88 (11 стрипов)	1335	89	89	1513
94	96 (12 стрипов)	1455	97	97	1649

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.2.4 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирки с приготовленной смесью и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 15 мкл приготовленной смеси.

7.2.6 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

После внесения образцов в пробирки стрипа следует закрывать крышку стрипа перед использованием следующего. Образцы биологического материала и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.2.7 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл образца биоматериала, взятого в транспортную среду.
- 7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 10 мкл положительного контрольного образца
- 7.2.9 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 10 мкл отрицательного контрольного образца.
- 7.2.10 Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР необходимо провести СРАЗУ после приготовления реакционных смесей с внесёнными образцами биоматериала. Не допускается хранение подготовленных пробирок до проведения исследования.

- 7.2.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 50 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблицах 4, 5.

При использовании приборов серии ДТ: запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите готовый файл с параметрами теста «SARS2_Lite». При последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	60	5	0	1		Цикл
2	92	1	0	1		Цикл
3	92	0	10	5		Цикл
	58	0	10			
	67	0	10			
4	92	0	5	25		Цикл
	58	0	10		√	
	64	0	10			
5	90	0	5	15		Цикл
	58	0	10		√	
	64	0	10			
6	80	0	1	1		Цикл
7	10	...	...	Хранение		Хранение

√- режим оптических измерений

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad)

№ блока (Step)	Температура, °C	Время мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	60	05:00	1
2	94	01:00	1
3	94	0:10	5
4	59	0:10	
5	67	0:10	
6	94	0:05	40
7	59 √	0:10	
8	64	0:10	

√- режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam и Hex при 62 °C

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad) следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression)
- 9.3 Интерпретация проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 – Интерпретация результатов исследования

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam	Hex	
Анализируемые образцы		
Cp/Cq ≤34	Не учитывается	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
Cp/Cq >34	Не учитывается	Полученный результат указывает на низкое содержание РНК коронавируса SARS-CoV-2, которое может быть связано с низкой вирусной нагрузкой в клиническом образце, с перекрёстной контаминацией высококопийными образцами или с ингибированием ОТ-ПЦР. Следует однократно провести повторное взятие биоматериала или повторное проведение ОТ-ПЦР с соблюдением мер, указанных в п.7.1. В случае повторения результата, следует выдать итоговый результат "Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2".
Cp/Cq не указан	Cp/Cq указан	РНК SARS-CoV-2 не обнаружена
Cp/Cq не указан	Cp/Cq не указан	Результат недостоверный
Положительный контрольный образец		
Cp/Cq указан	Не учитывается	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец		
Cp/Cq не указан	Cp/Cq указан	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

- 9.4 Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в образце биоматериала.

В случае подозрения на присутствие ингибиторов в образце биоматериала необходимо провести исследование методом, включающим выделение нуклеиновых кислот из образца биоматериала, или повторное взятие клинического материала.

- 9.5 При получении положительного результата амплификации специфического продукта (Cp/Cq указан) по каналу Fam в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

Предупреждения

Единичный отрицательный результат исследования не исключает инфекции.

Отрицательные результаты не исключают возможности инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2 и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.
- 10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, хранить в защищённом от света месте.
- 10.2.2 Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.
- 10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
 - Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, хранить в защищённом от света месте.
 - Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.
- 10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.
- 11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора реагентов		Нестерильно
	Дата изготовления		

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-2019 ЕСКД. Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

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 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документа, 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.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», ООО «ДНК-Технология ТС» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.
адрес: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Место производства:

ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов SARS-CoV-2 Лайт, следует обращаться в Службу клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Заместитель генерального директора по науке
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
к.б.н.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России,
академик РАН, профессор



Абрамов

Д.Д.Абрамов

«03» марта 2022 г.

Г.Т. Сухих

«03» марта 2022 г.



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 22

Федеральное) листа (ов)

Е.А. Пордун

Заведующий отделом научных исследований
и клинических испытаний
медицинских препаратов
ФГБУ ИИ «В.И. Кулаков» Минздрава России

