

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

«ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ»

(ООО «Люмэкс-маркетинг»)

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Люмэкс-маркетинг»



**НАБОР МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК КОРОНАВИРУСА
SARS-COV-2, ВИРУСОВ ГРИППА А И ГРИППА В МЕТОДОМ ОТ-ПЦР
С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ
«АриаДНА-SARS-CoV-2-InfA-InfB» по ТУ 21.20.23-014-45549798-2022,
серия 2231, серия 2232**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

02312-00-001 И

2022

Наименование медицинского изделия

Набор микрочипов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АриаДНА–SARS-CoV-2-InfA-InfB» по ТУ 21.20.23-014-45549798-2022, серия 2231, серия 2232 (далее по тексту - набор, набор микрочипов).

Сокращенное наименование: набор микрочипов «АриаДНА–SARS-CoV-2-InfA-InfB».

Набор изготавливается по ТУ 21.20.23-014-45549798-2022.

Назначение медицинского изделия

Набор предназначен для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В в биологическом материале человека (мазки из носоглотки и ротоглотки) методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Набор применяется совместно с медицинским изделием «Амплификатор микрочиповый нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА» по ТУ 9443-021-45549798-2011» (ПУ № ФСР 2011/12249).

Функциональное назначение медицинского изделия: для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В у лиц всех возрастов с симптомами ОРВИ и лиц без признаков ОРВИ, контактировавших с больным COVID-19 и другими ОРВИ. Для раннего выявления коронавируса SARS-CoV-2, гриппа А и гриппа В и предотвращения дальнейшего распространения инфекции в очагах инфекции/ в условиях распространения инфекции.

Исследуемый биологический материал: пробы РНК, полученные путем экстракции РНК из клинических образцов (мазки из носоглотки и ротоглотки). В соответствии с Временными методическими рекомендациями «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», основным видом биоматериала для лабораторного исследования на РНК SARS-CoV-2 является материал, полученный при заборе мазка из носоглотки (из двух носовых ходов) и ротоглотки.

Целевой анализ - специфические последовательности РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика. Набор предназначен только для применения *in vitro*.

Условия применения набора - клиничко-диагностические лаборатории лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждений.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия
- применение набора микрочипов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

Потенциальный пользователь:

- только для профессионального использования;
- проведение клинических анализов – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник;
- интерпретация результатов анализов и выдача заключений – врач клинической лабораторной диагностики.

Показания к применению - необходимость проведения лабораторного обследования на COVID-19 различных категорий лиц в соответствии с Временными методическими рекомендациями «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», а также лиц с выраженными симптомами ОРВИ для дифференцирования возбудителей инфекции.

Противопоказания- не выявлены.

Побочные действия - при соблюдении потребителем условий и правил транспортирования, хранения и применения, побочные действия не выявлены.

По режиму применения набор относится к медицинским изделиям однократного действия.

Набор техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Сведения о производителе

Общество с ограниченной ответственностью «Люмэкс-маркетинг» (ООО «Люмэкс-маркетинг»)

Адрес: ул. Обручевых, д.1, литер Б, Санкт-Петербург, 195220 Россия

Почтовый адрес: BOX 1234, г. Санкт-Петербург, 190900 Россия

Тел/факс: (812)335-03-36

Электронная почта: lumex@lumex.ru

Веб-сайт: <http://www.lumex.ru>

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип метода основан на выявлении специфических последовательностей РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР и включает в себя четыре этапа: экстракцию (выделение) РНК из образцов клинического материала, обратную транскрипцию, амплификацию фрагментов кДНК и детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

Материалом для проведения обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР служат пробы РНК, полученные путем экстракции РНК из клинических образцов (мазки из носоглотки и ротоглотки).

Микрочипы содержат набор олигонуклеотидных праймеров и зондов, соответствующих последовательности гена, кодирующего участок вирусного нуклеокапсида (N) коронавируса SARS-CoV-2, набор олигонуклеотидных праймеров и зондов, соответствующих последовательности гена, кодирующего участок матричного белка М1 вируса гриппа А, набор олигонуклеотидных праймеров и зондов, соответствующих последовательности гена, кодирующего участок неструктурного белка 1 (NS1) вируса гриппа В, а также дополнительный набор праймеров и зондов для обнаружения гена РНКазы Р человека (HsRPP30). Реакция обратной транскрипции проводится с целью образования комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК, выделенной и очищенной из клинических образцов. Затем проводится амплификация, при этом зонды связываются со специфической последовательностью мишени, расположенной между прямым и обратным праймером. Во время фазы элонгации ПЦР-цикла 5'-нуклеазная активность Таq-полимеразы разрушает зонд, вызывая отделение флуорофора от гасителя флуоресценции, в результате чего генерируется флуоресцентный сигнал. С каждым циклом молекулы флуорофора отщепляются от соответствующих зондов, увеличивая интенсивность флуоресценции, регистрируемую в каждом цикле ПЦР с помощью микрочипового амплификатора.

Состав набора

Набор микрочипов выпускается в следующих вариантах исполнения в зависимости от количества микрореакторов, а также состава лиофильной смеси в микрореакторах микрочипов, входящих в набор:

Комплектация 1 - в состав набора входят микрочипы из нержавеющей стали с 30 микрореакторами в индивидуальной упаковке с десикантом, пробирка с буферным раствором, флакон с герметизирующей жидкостью, инструкция по применению набора, паспорт;

Комплектация 2 - в состав набора входят микрочипы из нержавеющей стали с 48 микрореакторами в индивидуальной упаковке с дессикантом, пробирка с буферным раствором, флакон с герметизирующей жидкостью, инструкция по применению набора, паспорт

Набор микрочипов рассчитан на проведение 25 серий анализов по 12 проб (для комплектации 1) или 21 пробы (для комплектации 2) на каждом микрочипе.

Выбор комплектации осуществляется пользователем в зависимости от необходимого объема исследований, а также для большего удобства пользователя в зависимости от условий клинико-диагностической лаборатории.

Комплектация набора микрочипов приведена в таблице 1.

Таблица 1 - Варианты комплектации

Вариант исполнения	Наименование и тип фасовки компонента набора	Объем компонента, мл	Количество
Комплектация 1	Микрочипы с 30 микрореакторами с иммобилизованными ПЦР-смесями для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В (в индивидуальной упаковке с дессикантом)	–	25 шт.
	Буферный раствор (микропробирка с завинчивающейся крышкой)	0,75	1 шт.
	Герметизирующая жидкость (флакон)	30	1 шт.
	Инструкция по применению	–	1 экз.
	Паспорт	–	1 экз.
Комплектация 2	Микрочипы с 48 микрореакторами с иммобилизованными ПЦР-смесями для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и гриппа В (в индивидуальной упаковке с дессикантом)	–	25 шт.
	Буферный раствор (микропробирка с завинчивающейся крышкой)	0,75	1 шт.
	Герметизирующая жидкость (флакон)	30	1 шт.
	Инструкция по применению	–	1 экз.
	Паспорт	–	1 экз.

Информация о прослеживаемости значений, заданных для ПКО

Нуклеотидная последовательность ПКО для определения коронавируса SARS-CoV-2 полностью гомологична геному коронавируса SARS-CoV-2 (фрагмент гена N 28237-28308 генома коронавируса SARS-CoV-2 по референсной последовательности OM841042.1), одну копию которого содержит каждый вирион коронавируса SARS-CoV-2.

Нуклеотидная последовательность ПКО для определения вируса гриппа А полностью гомологична геному вируса гриппа А (фрагмент гена матричного белка М1 156-261 генома вируса гриппа А по референсной последовательности MT015477.1), одну копию которого содержит каждый вирион вируса гриппа А.

Нуклеотидная последовательность ПКО для определения вируса гриппа В полностью гомологична геному вируса гриппа В (фрагмент гена неструктурного белка 1 (NS1) вируса гриппа В 746-848 по референсной последовательности ON369798.1), одну копию которого содержит каждый вирион вируса гриппа В.

Образец ПКО представляет собой иммобилизованную в ячейке синтетическую последовательность ДНК, специфичную для каждого определяемого патогена, в концентрации $5 \cdot 10^4$ копий/мл.

Описание микрочипа

Микрочип функционально состоит из следующих частей (рис. 1):

- подложка – изготовлена из термостойкого пластика и предназначена для удобства ввода микрочипа в картридж. На верхней части расположен штрихкод, в котором заложена информация о топологии микрочипа;
- реакционная зона - представляет собой металлическую пластину с вытравленными в ней микрореакторами (30 или 48 микрореакторов в зависимости от варианта исполнения), сверху покрыта защитной пленкой;
- рабочая поверхность – ровная сторона пластины.

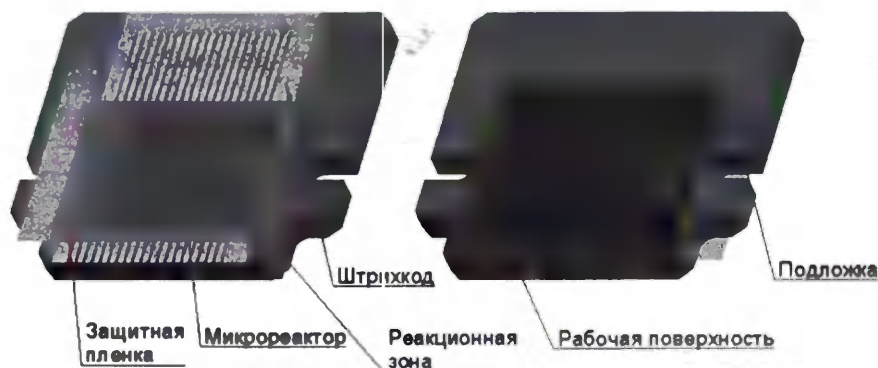


Рисунок 1- Внешний вид микрочипа

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора должна составлять не более $1 \cdot 10^4$ копий/мл для РНК вируса SARS-CoV-2, вируса гриппа А и вируса гриппа В.

Аналитическая специфичность

В микрореакторах для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 неспецифическая амплификация с РНК *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, *Human rhinovirus*, *Human parainfluenza virus*, *Human orthopneumovirus*, *Human Adenovirus type 5* в концентрации до 10^9 копий/мл должна отсутствовать.

В микрореакторах для выявления РНК вирусов гриппа А и гриппа В неспецифическая амплификация с РНК *Human rhinovirus*, *Human parainfluenza virus*, *Human orthopneumovirus*, *Human Adenovirus type 5* в концентрации до 10^9 копий/мл и РНК Coronavirus SARS-CoV-2 в концентрации до 10^5 копий/мл должна отсутствовать.

Аналитическая специфичность подтверждена *in silico*. Микрочипы, входящие в состав набора, содержат набор олигонуклеотидных праймеров и зондов, соответствующих последовательности гена, кодирующего участки матричного белка М1 и М2 (для обнаружения вируса гриппа А), участок экспортного белка (NEP) и неструктурный белок 1 (NS1) (для обнаружения вируса гриппа В), вирусного нуклеокапсида (N) коронавируса SARS-CoV-2. Для всех проанализированных микроорганизмов (*Human coronavirus 229E*, *Human coronavirus OC43*, *Human coronavirus HKU1*, *Human coronavirus NL63*, *Coronavirus HCoV-SARS*, *Coronavirus MERS-CoV*, *Human adenovirus (e.g. C1 Ad. 71)*, *Human Metapneumovirus (hMPV)*, *Human parainfluenza virus 1-4*, *Human enterovirus (e.g. EV68)*, *Human orthopneumovirus*, *Human Rhinovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pneumocystis jirovecii (PJP)*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*) гомологии с нуклеотидными последовательностями праймеров и зондов *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, SARS-CoV-2 не обнаружено. Таким образом, неспецифическая амплификация, которая могла бы привести к перекрестной реакции или повлиять на амплификацию целевых участков *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, SARS-CoV-2, крайне маловероятна.

Повторяемость, внутрисерийная воспроизводимость

Повторяемость была проверена с использованием ОКО, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^5$ копий/мл фрагмента РНК SARS-CoV-2, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^5$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza A virus*, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^5$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza B virus*, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^4$ копий/мл фрагмента РНК SARS-CoV-2, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^4$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza A virus*, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^4$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza B virus*, девяти положительных проб и одной отрицательной пробы для вариантов исполнения Комплектация 1 и Комплектация 2. Для всех образцов и всех комплектаций повторяемость превышает 95 % при постановке ПЦР в пяти повторностях.

Внутрисерийная воспроизводимость была проверена с использованием ОКО, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^5$ копий/мл фрагмента РНК SARS-CoV-2, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^5$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza A virus*, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^5$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza B virus*, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^4$ копий/мл фрагмента РНК SARS-CoV-2, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^4$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza A virus*, контрольного образца, содержащего $1 \cdot 10^4$ копий/мл фрагмента РНК *Influenza B virus*, девяти положительных проб и одной отрицательной пробы для вариантов исполнения Комплектация 1 и Комплектация 2. Для всех образцов и всех комплектаций внутрисерийная воспроизводимость превышает 95 % при постановке ПЦР в пяти повторностях на микрочипах, отобранным случайным образом из разных наборов, относящихся к одной и той же серии.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Обобщенные результаты тестов, показатели клинической эффективности и их доверительные интервалы для доверительной вероятности 0,95 для бинарного распределения вероятности приведены в таблице 2.

Таблица 2

Наименование параметра	Комплектация 1			Комплектация 2		
	Выявление РНК корона-вируса SARS-CoV-2	Выявление РНК вируса гриппа А	Выявление РНК вируса гриппа В	Выявление РНК корона-вируса SARS-CoV-2	Выявление РНК вируса гриппа А	Выявление РНК вируса гриппа В
Общее число клинических проб	124	124	124	124	124	124
Число истинно положительных результатов	31	24	25	31	24	25
Число истинно отрицательных результатов	93	99	99	93	99	99
Число ложноположительных результатов	0	0	0	0	0	0
Число ложноотрицательных результатов	0	1	0	0	1	0
Диагностическая чувствительность (ДЧ), %	100	96	100	100	96	100
Доверительный интервал для ДЧ (95 % ДИ), %	88,8 - 100,0	79,7 - 99,9	86,3 - 100,0	88,8 - 100,0	79,7 - 99,9	86,3 - 100,0
Диагностическая специфичность (ДС), %	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал для ДС (95 % ДИ), %	96,1 - 100,0	96,3 - 100,0	96,3 - 100,0	96,1 - 100,0	96,3 - 100,0	96,3 - 100,0

Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной получения недостоверных результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие аналитического сигнала во всех ячейках одной пробы.

Источником ингибирования ПЦР могут быть вещества, присутствующие в пробе РНК в результате неполного удаления реагентов при выделении и очистке РНК (при несоблюдении требований инструкции по применению рекомендованных наборов для выделения РНК).

Ингибирующего влияния эндогенных (цельная кровь 5% об.) и экзогенных (Хлоргексидин 0,05%, Мирамистин 0,01%, Називин 0,05 %) потенциально интерферирующих веществ на результат ОТ-ПЦР при исследовании образцов набором не обнаружено.

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала (кровь, слизь, местные лекарственные препараты и т.п.), полностью удаляются при выделении и очистке РНК с использованием рекомендованных наборов. Однако, для снижения вероятности ингибирования

должны быть приняты меры по соблюдению правила забора биологического материала (в частности, предупреждение пациента о недопустимости использования местных лекарственных препаратов, в том числе назальных спреев не менее, чем за 2 ч до взятия материала). Не рекомендуется использовать для выделения РНК термокоагуляционные методы, т.к. они не обеспечивают полную очистку пробы РНК от ингибиторов ПЦР.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора: 3 (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 №4н).

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

Клинические образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать возбудители вирусных инфекций.

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, согласно требованиям МР 3.1.0169, МУ 1.3.2569 и Временных методических рекомендаций Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

Работа с набором должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III-IV группы патогенности, с соблюдением требований СанПиН 3.3686 и МУ 1.3.2569.

Экстракция РНК из клинических образцов проводится в боксах биологической безопасности II класса с включенным ламинарным потоком.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с набором следует надевать одноразовые неопудренные одноразовые перчатки (латексные, нитрильные, виниловые).

Химическая посуда и оборудование, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

Запрещается прием пищи, использование косметических средств и контактных линз, курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Набор 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.

При случайном попадании компонентов набора на кожу и слизистые оболочки необходимо промыть их большим количеством проточной воды и при необходимости обратиться к врачу. При случайном проглатывании компонентов набора следует обратиться к врачу.

Не допускается использование набора при нарушении условий транспортирования и хранения, по истечении срока годности, при несоответствии внешнего вида и внутренней упаковки компонентов, указанного в паспорте, при нарушении внутренней упаковки компонентов набора.

При работе с набором следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Комплект реагентов для выделения и очистки РНК (рекомендуется комплект реагентов «РИБО-сорб» (РУ № ФСР 2008/03993), ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Допускается использование других наборов для экстракции РНК из клинических образцов мазков из носоглотки и ротоглотки, зарегистрированных в РФ и предназначенных для экстракции и очистки РНК из данного вида биоматериала.

2. Дополнительные материалы и оборудование для выделения РНК — согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.

3. ОКЭ (отрицательный контроль экстракции). Необходим для подтверждения выделения РНК, а также стабильности работы набора для выделения РНК, используется в качестве контроля экстракции и положительного контроля для набора праймеров и зонда для HsRPP30. РНК из ОКЭ следует выделять с каждой партией клинических образцов, из которых одновременно выделяют РНК, следует использовать в качестве контроля при каждой постановке ПЦР. В качестве ОКЭ в лабораториях может быть приготовлен пул отрицательных клинических образцов (например, образцов сыворотки или образцов из респираторного тракта) или искусственные контрольные материалы, приготовленные путем сус-

пендирования любой клеточной линии человека (например, A549, Hela или 293) в фосфатно-солевом буфере. Материал должен быть протестирован перед использованием в качестве контроля экстракции для обеспечения получения ожидаемых результатов для HsRPP30, перечисленных в настоящей инструкции.

4. Деионизованная вода (без РНҚаз и ДНҚаз).
5. Амплификатор микрочиповый нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА» (РУ № ФСР 2011/12249, ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия).
6. ПЦР-бокс.
7. Центрифуга/вортекс.
8. Дозаторы механические одноканальные с варьируемым объемом дозирования 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл.
9. Дозатор электронный одноканальный с варьируемым объемом дозирования 0,5-10 мкл.
10. Одноразовые наконечники для дозаторов с фильтром.
11. Стерильные пробирки для ПЦР объемом 200-600 мкл.
12. Штативы для микропробирок.
13. Перчатки медицинские одноразовые неопудренные.
14. Халаты, шапочки
15. Контейнер для сбора отходов.
16. Дезинфицирующий раствор.
17. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 18 °С.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Взятие клинического материала, упаковку, транспортировку и хранение проб следует проводить в соответствии с Временными методическими рекомендациями Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» и МУ 1.3.2569.

Материалом для исследования служат клинические образцы (мазки из носоглотки и ротоглотки).

Мазки из носоглотки и ротоглотки отбирают стерильными тампонами (например, «Зонд медицинский одноразовый стерильный по ТУ 32.50.13-002-28731857-2020» производства ООО «ФармМедПолис РТ», Россия, РУ № РЗН 2021/13989), которые после взятия материала помещают в стерильную пластиковую пробирку с транспортной средой (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков по ТУ

9398-083-01897593-2009» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ № ФСР 2009/05011). Для повышения концентрации вируса мазки из носоглотки и ротоглотки рекомендуется помещать в одну пробирку.

Отбор клинического материала, его упаковку и транспортировку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности.

Выделение РНК из подготовленного клинического материала проводится в соответствии с инструкцией к используемому набору для выделения нуклеиновых кислот.

При проведении анализа рекомендуется использование образцов с массовой концентрацией РНК 20–500 нг/мкл.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка к проведению анализа

Пробирки с буферным раствором и флакон с герметизирующей жидкостью выдерживают 15 минут при комнатной температуре. Содержимое пробирки с буферным раствором тщательно перемешивают, капли со стенок пробирок осаживают кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (3 с).

Подготовка микрочипа

Перед использованием микрочип в индивидуальной упаковке извлечь из картонной коробки, убедиться в целостности индивидуальной упаковки. Микрочипы с поврежденной индивидуальной упаковкой использованию не подлежат и должны быть утилизированы. Затем следует извлечь микрочип, убедиться в его целостности, наличии штрихкода и отсутствии трещин и сколов в реакционной зоне и на рабочей поверхности микрочипа.

Запрещено касаться реакционной зоны пальцами.

Аккуратно удалить защитную пленку с микрочипа. Убедиться в сохранности штрихкода на микрочипе.

Вставить микрочип в картридж. Картридж должен быть расположен на рабочей поверхности так, чтобы было хорошо видно все микрореакторы микрочипа.

Все дальнейшие манипуляции с микрочипом следует проводить только в картридже.

Перед проведением анализа реакционную зону микрочипа покрыть герметизирующей жидкостью в объеме 620 мкл (рис. 2) при помощи механического дозатора, используя одноразовый наконечник с фильтром. Отбор герметизирующей жидкости следует прово-

дуть медленно, избегая образования пузырьков воздуха внутри наконечника пипетки. Ввести отобранную герметизирующую жидкость в реакционную зону микрочипа, не касаясь при этом краев микрореакторов одноразовым наконечником.

Герметизирующая жидкость должна покрывать всю реакционную зону однородным слоем, недопустимо образование пузырьков на поверхности жидкости.

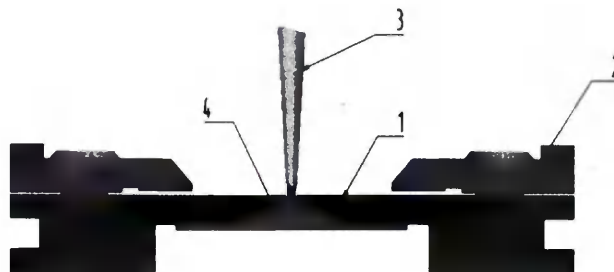


Рисунок 2 - Ввод герметизирующей жидкости в микрочип: 1 — реакционная зона микрочипа, 2 — картридж, 3 — одноразовый наконечник, 4 — герметизирующая жидкость.

После герметизации микрочипа все дальнейшие манипуляции с картриджем должны обеспечивать его горизонтальное расположение. Необходимо следить, чтобы герметизирующая жидкость не вытекала за пределы реакционной зоны через края подложки.

Подготовка проб РНК

1 В случае работы с набором в Комплектации 1:

3.1 Подготовить рабочую смесь мастермикса. Для этого в пробирке смешать 26,8 мкл деионизованной воды и 8,2 мкл буферного раствора. Тщательно перемешать, капли со стенок пробирки осадить кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе в течение 3 с.

3.2 Отобрать и промаркировать 15 микропробирок:

- а. 12 пробирок для проб (№№ 1–12);
- б. 1 пробирка (№13) для ОКЭ (отрицательного контроля экстракции);
- в. 1 пробирка (№14) для ОКО (отрицательного контрольного образца);
- г. 1 пробирка (№15) для ПКО (положительного контрольного образца).

3.3 В пробирки №№ 1–12 внести по 2 мкл рабочей смеси мастермикса и по 1,1 мкл проб РНК, выделенных из клинических образцов.

В пробирку №13 внести 2 мкл рабочей смеси мастермикса и 1,1 мкл образца ОКЭ.

В пробирку №14 внести 2 мкл рабочей смеси мастермикса и 1,1 мкл деионизованной воды.

В пробирку №15 внести 2 мкл рабочей смеси мастермикса и 1,1 мкл деионизированной воды.

3.4 Полученные смеси тщательно перемешать, капли со стенок пробирок осадить кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (3 с).

3.5 В соответствии с топологией микрочипа (рис. 3) ввести смеси с пробами (№№ 1–12) в микрореакторы в объеме 1,2 мкл под слой герметизирующей жидкости. Аналогично в микрореакторы для ОКЭ внести смесь из пробирки № 13. В микрореакторы для ОКО внести смесь из пробирки №14, в микрореакторы для ПКО внести смесь из пробирки №15.



Рисунок 3 - Схема внесения проб в микрореакторы микрочипа «АриаДНА–SARS-CoV-2-InfA-InfB» (Комплектация 1).

2 В случае работы с набором в Комплектации 2:

4.1 Подготовить рабочую смесь мастермикса. Для этого в пробирке смешать 42,1 мкл деионизированной воды и 12,9 мкл буферного раствора. Тщательно перемешать, капли со стенок пробирки осадить кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе в течение 3 с.

4.2 Отобрать и промаркировать 24 микропробирки 0,2 мл:

- а. 45 пробирок для проб (№№ 1–21);
- б. 1 пробирка (№22) для ОКЭ (отрицательного контроля экстракции);
- в. 1 пробирка (№23) для ОКО (отрицательного контрольного образца);
- г. 1 пробирка (№24) для ПКО (положительного контрольного образца).

4.3 В пробирки №№ 1–21 внести по 2 мкл рабочей смеси мастермикса и по 1,1 мкл проб РНК, выделенных из клинических образцов.

В пробирку №22 внести 2 мкл рабочей смеси мастермикса и 1,1 мкл образца ОКЭ.

В пробирку №23 внести 2 мкл рабочей смеси мастермикса и 1,1 мкл деионизированной воды.

В пробирку №24 внести 2 мкл рабочей смеси мастермикса и 1,1 мкл деионизированной воды.

4.4 Полученные смеси тщательно перемешать, капли со стенок пробирок осадить кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (3 с).

4.5 В соответствии с топологией микрочипа (рис. 4) ввести смеси с пробами (№№ 1–21) в микрореакторы в объеме 1,2 мкл под слой герметизирующей жидкости. Аналогично в микрореакторы для ОКЭ внести смесь из пробирки №22. В микрореакторы для ОКО внести смесь из пробирки №23, в микрореакторы для ПКО внести смесь из пробирки №24.



Рисунок 4 - Схема внесения проб в микрореакторы микрочипа «АриаДНА–SARS-CoV-2-InfA-InfB» (Комплектация 2).

После окончания работы пробирки с буферным раствором и флакон с герметизирующей жидкостью убрать и хранить при температуре не выше минус 18 °С.

Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Управление амплификатором микрочиповым нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА» (далее по тексту - амплификатор), в том числе и проведение анализа образцов, осуществляется при помощи программного обеспечения AriaDNA. Полная информация о проведении анализа представлена в Руководстве пользователя к программному обеспечению микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА».

Поместить картридж с микрочипом в термоблок амплификатора. Во время проведения анализа термоблок должен быть плотно закрыт.

В основном окне программы выбрать меню «Анализ», в окне «Менеджер проектов» выбрать проект анализа «АриаДНА–SARS-CoV-2-InfA-InfB» или нажать кнопку «Считать штрихкод», или ввести штрихкод вручную в поле ввода, и далее нажать кнопку «Загрузить».

Во вкладке «Терморежим» меню «Анализ» проверить соответствие и при необходимости установить программу амплификации в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 - Параметры термопротокола

Этап	Температура, °C	Время, с	Кол-во циклов
1	42	300	1
2	95	120	1
3	95	2	45
	55	20*	
* На этом этапе производится регистрация сигнала			

Назначить детекцию флуоресцентного сигнала на стадии второго цикла амплификации, поставив флажок в поле «Снятие кадра».

Во вкладке «Детектирование» для флуорофоров FAM и ROX проверить соответствие и при необходимости установить параметры, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Параметры детектирования сигнала флуоресценции

Канал	Выдержка, мс	Усиление	Задержка, мс
FAM	400	100	0
ROX	800	100	

Во вкладке «Шаблоны» проверить соответствие шаблона прилагаемой в документации топологии микрочипа и при необходимости определить микрореакторы по

Образцу и Каналам в соответствии с топологиями микрочипа (рис. 3-6). Флуоресцентный сигнал, соответствующий Influenza A и SARS-CoV-2 N регистрируется по каналу FAM; флуоресцентный сигнал, соответствующий Influenza B и HsRPP30 (эндогенный контроль) регистрируется по каналу ROX.

Во вкладке «Шаблоны» в таблице ввести идентификаторы проб (в графу Имя) и описание проб (в графу Описание).

Запустить программу амплификации, нажав кнопку «Старт»  .

Регистрация результатов

Регистрация результатов амплификации происходит в режиме «реального времени». Изменение уровней флуоресценции по каналам FAM и ROX отображается в закладке «Графики».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводится с помощью программного обеспечения микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА».

В меню «Настройки графиков» отметить флажком опцию «Сглаживание» и установить настройки расчетов согласно таблице 5.

Таблица 5 - Настройки расчетов

Параметр	Значение
Длина волны, циклов	2
Удалять фон	Экспоненциальный фон
Кол-во выбросов	2
Приращение сигнала	150
Приращение производной	50

Для автоматического расчета значений пороговых циклов (Ct) в правом поле рабочего окна программы выбрать в выпадающем списке вариант «SDM» (Second Derivative Maximum, алгоритм максимума второй производной).

Интерпретация результатов анализа для контрольных материалов

Интерпретация результатов для контрольных материалов приведена в таблице 6.

Результат анализа считается достоверным, если выполнены следующие условия:

1. Для ПКО по каналу FAM и по каналу ROX значения пороговых циклов не превышают 40. При отрицательном результате для любой тест-системы результаты анализа считают недействительными вследствие неправильных настроек при проведении анализа. Данный анализ следует повторить;

2. Для ОКО по каналам FAM и ROX $Ct=0$ или $Ct>40$. Если хотя бы для одной тест-системы значение порогового цикла $0 < Ct < 40$, говорят о контаминации или неправильных настройках при проведении ПЦР-анализа. Результаты анализа считаются недействительными, анализ следует повторить;

3. Для ОКЭ по каналу FAM (Influenza A и SARS-CoV-2 N) $Ct=0$ или $Ct>40$, при этом по каналу ROX для Influenza B $Ct=0$ или $Ct>40$ и для HsRPP30 значение порогового $Ct<40$. Если по каналу FAM (Influenza A и SARS-CoV-2 N) и по каналу ROX (Influenza B) значение порогового цикла $0<Ct<40$, делают вывод о контаминации на этапе выделения РНК или подготовки ПЦР-смесей. В этом случае следует заново выделить РНК из образцов и заново провести анализ.

Таблица 6 – Интерпретация результатов для контрольных материалов

Контроль	Ожидаемые результаты				Возможные причины получения неправильных результатов
	InfA/InfB		SARS N/HRP		
	Inf A (FAM)	Inf B (ROX)	SARS N (FAM)	HRP (ROX)	
ОКО	—*	—	—	—	Контаминация реагентов для приготовления ПЦР-смесей
ПКО	+++	+	+	+	Неправильные настройки анализа, проблема с реагентами, деградация лиофилизированных реагентов
ОКЭ	—	—	—	+	Перекрестная контаминация при выделении РНК или подготовке ПЦР-смесей
* Значение порогового цикла Ct=0 или Ct >40					
** Значение порогового цикла 0<Ct <40					

Если хотя бы одно из перечисленных условий не выполняется, то результаты анализа считаются недействительными, и рекомендуется повторная постановка ПЦР-анализа.

Интерпретация результатов анализа для проб РНК

Интерпретация результатов для проб РНК приведена в таблицах 7 и 8.

Таблица 7 – Интерпретация результатов анализа проб

Inf A (FAM)	Inf B (ROX)	SARS N (FAM)	HRP (ROX)	Интерпретация результата	Действия
—*	—	+**	+/-	РНК SARS-CoV-2 обнаружена	Выдать результат
+	—	—	+/-	РНК Inf A обнаружена	Выдать результат
—	+	—	+/-	РНК Inf B обнаружена	Выдать результат
—	—	—	+	РНК SARS-CoV-2, Inf A, Inf B не обнаружены	Выдать результат
—	—	—	—	Недостоверный результат анализа	Заново выделить РНК/ повторный забор клинического образца

* Значение порогового цикла Ct=0 или Ct >40
 ** Значение порогового цикла 0<Ct <40

Выявленная последовательность HsRPP30 в каждой пробе выделенной РНК служит эндогенным внутренним контролем. Пробы РНК, выделенные из каждого клинического образца, при соблюдении условий взятия, хранения, выделения, содержат последовательность HsRPP30, и дают положительный результат по каналу ROX (HsRPP30), значения пороговых циклов не должны превышать Ct=40.

Таблица 8 – Другие возможные результаты ПЦР

Inf A (FAM)	Inf B (ROX)	SARS N (FAM)	HRP (ROX)	Интерпретация результата	Действия
+**	—*	+	+/-	РНК SARS-CoV-2, РНК Inf A обнаружены	Выдать результат
+	+	—	+/-	РНК Inf A, РНК Inf B обнаружены	Выдать результат
—	+	+	+/-	РНК SARS-CoV-2, РНК Inf B обнаружены	Выдать результат
+	+	+	+/-	РНК SARS-CoV-2, РНК Inf A, РНК Inf B обнаружены	Выдать результат

* Значение порогового цикла Ct=0 или Ct >40
 ** Значение порогового цикла 0<Ct <40

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ, РЕМОНТ

Техническое обслуживание не предусмотрено. Не ремонтпригодно.

УТИЛИЗАЦИЯ

После проведения анализа следует утилизировать использованный микрочип. Для этого следует:

- извлечь картридж с микрочипом из амплификатора;
- извлечь микрочип из картриджа и поместить в утилизационную емкость, заполненную дезинфицирующим средством.

После утилизации отработанного микрочипа требуется провести очистку картриджа безворсовой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором.

В процессе использования набора микрочипов и утилизации набора микрочипов с истекшим сроком годности токсичные отходы не образуются.

Отходы, образующиеся в процессе использования и утилизации набора микрочипов с истекшим сроком годности, а также микрочипов с дефектами упаковки следует относить к классу Б.

Обращение (сбор, временное хранение, обеззараживание и/или обезвреживание и транспортирование) с отходами, образующимися в процессе использования и утилизации набора микрочипов с истекшим сроком годности, проводят согласно СанПин 3.3686, СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов использовать зарегистрированные в РФ дезинфицирующие средства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортирование

Транспортировать наборы следует всеми видами крытых транспортных средств при температуре от 2 °С до 8 °С в течение не более 3 суток. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима и/или длительности, применению не подлежат.

Хранение

Наборы следует хранить при температуре не выше минус 18 °С в упаковке изготовителя до окончания срока годности набора, указанного на упаковке.

Срок годности – 12 месяцев с даты приемки ОТК изготовителя при условии соблюдения условий транспортирования и хранения.

Микрочипы после вскрытия индивидуальной упаковки хранению не подлежат и должны быть сразу же использованы или утилизированы.

Наборы, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Изготовитель гарантирует стабильность и соответствие качества набора микрочипов требованиям ТУ 21.20.23-014-45549798-2022 при соблюдении потребителем условий и правил транспортирования, хранения и применения, установленных указанными техническими условиями, в течение всего срока годности.

АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЙ

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу:

ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия, 195220, Санкт-Петербург, ул. Обручевых, д.1, литер Б.

Тел/факс: (812)335-03-36

Электронная почта: lumex@lumex.ru

Веб-сайт: <http://www.lumex.ru>

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ ДОКУМЕНТОВ

СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

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

МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности

МР 3.1.0169-20 Лабораторная диагностика COVID-19.

Временные методические рекомендации Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

ТУ 9443-021-45549798-2011 Амплификатор микрочиповый нуклеиновых кислот в режиме реального времени «АриаДНА». Технические условия

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ДИ	Доверительный интервал
ОКО	Отрицательный контрольный образец
ПКО	Положительный контрольный образец
ОКЭ	Отрицательный контроль экстракции
ОРИ	Острая респираторная инфекция
ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией
ПКО	Положительный контрольный образец
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Не допускать воздействия солнечного света
	Дата изготовления		Хрупкое, обращаться осторожно
	Срок годности		Беречь от влаги
	Номер серии		Запрет на повторное применение
	Верхняя граница температурного диапазона		Не использовать при повреждении упаковки
	Предел температуры		Обратитесь к инструкции по применению

Инженер-исследователь, к.б.н.



Анискина А.И.



Пронумеровано, прошито
и скреплено печатью на 24 (двадцать четыре) листах

ООО «ЮМЭКС-МАРКЕТИНГ»
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ИЛИМОВА Ирина
ОЛЕГОВНА