

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"СКРИНИНГ-М"
МОСКВА

Набор реагентов для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

по ТУ 21.10.60-009-92463794-2021

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV-2	- коронавирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
РНК	- рибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО-SARS-CoV-2	- положительный контрольный образец
Ct	- пороговый цикл
МУ	- методические указания
НК	- нуклеиновая кислота
ОТ-ПЦР-РВ	- реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
СП	- санитарные правила
ГЭ/мл	- геномный эквивалент на миллилитр биоматериала

1. Назначение набора

Настоящая инструкция по применению (далее – ИП) распространяются на Набор реагентов для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «ПЦР-КОРОНАВИРУС-SARS-CoV-2-СКРИНИНГ» по ТУ 21.10.60-004-92463794-2020 (далее по тексту – Набор реагентов или Набор).

Назначение. Набор реагентов предназначен для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) в пробах НК, выделенных из клинических образцов человека (мазков из носоглотки и ротоглотки, мокроты) с признаками ОРИ и без признаков ОРИ (у категорий лиц в соответствии с действующими методическими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19) методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной

детекцией в режиме «реального времени». Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или социальному признаку.

Область применения. Клиническая лабораторная диагностика.

Потенциальный потребитель. Персонал клинической лаборатории, специально обученный методам ПЦР в реальном времени.

Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора - поддержка диагностики коронавируса SARS-CoV-2, мониторинг для выявления источника инфекции и оценки эффективности лечения. Вспомогательное средство в диагностике COVID-19.

Показания к применению. Необходимость определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), в биологическом материале человека методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Противопоказания. Противопоказанием к применению набора реагентов является нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

Исследуемый биологический материал.

Анализируемыми пробами являются НК, выделенные из клинических образцов (мокрота, мазки из носоглотки и ротоглотки), взятых у лиц с симптомами респираторного заболевания, в том числе с подозрением на инфекцию COVID-19, а также у лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний и не являющихся контактными больными с COVID-19

Класс в зависимости от степени потенциального риска применения в медицинских целях в соответствии с номенклатурным классификатором медицинских изделий, утвержденным приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06 июня 2012 г. № 4н – 3.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 и НК внутреннего контрольного образца (НК бактериофага MS2) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

Время анализа составляет 1,5 часа. Области амплификации указаны в таблице 1.

Таблица 1. Амплифицируемые фрагменты генома.

НК-мишень	Область амплификации
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	nucleocapsid protein (N) ген
РНК внутреннего контрольного образца	assembly protein (mat) ген

2.2. Состав и варианты исполнения набора реагентов

Таблица 2. Состав набора

Реагент	Описание	Вариант исполнения	
		Качественный, базовый - 50	Качественный, базовый - 100
ПЦР-смесь-SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная или светло-голубая жидкость.	0,25 мл 1 пробирка	0,5 мл 1 пробирка
RT PCR ENZ.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,038 мл 1 пробирка	0,075 мл 1 пробирка
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл 1 пробирка	1,0 мл 1 пробирка
РНК буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл 1 пробирка	1,0 мл 1 пробирка
ПКО-SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1 мл 1 пробирка	0,2 мл 1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0 мл 1 пробирка	2,0 мл 1 пробирка
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл 1 пробирка	1,0 мл 1 пробирка
Паспорт	-	1 шт.	1 шт.

качества			
Инструкция	-	1 шт.	1 шт.

В каждой пробирке одновременно происходит 2 реакции - определение НК возбудителя и НК внутреннего контрольного образца (НК бактериофага MS2) (см. таблицу 3).

Таблица 3. Регистрация результатов по каналам детекции.

Канал для флуорофора	ROX	Cy5
Длины волн света возбуждение/детекция	585±5 nm / 610±5 nm	625±10 nm / 660±10 nm
НК-мишень	PHK SARS-CoV-2	PHK бактериофага MS2

Внимание! В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

1. ПЦР-смесь-SARS-CoV-2: специфические праймеры и зонды: водный раствор двух олигонуклеотидных праймеров и одного олигонуклеотидного зонда (специфичных для генома SARS-CoV-2); праймеры и зонд для внутреннего контроля: водный раствор специфичных для генома бактериофага MS2 двух олигонуклеотидных праймеров и одного зонда; эквимольная смесь дезоксинуклеозид-трифосфатов (дНТФ); деионизованная вода.
2. RT PCR ENZ: ДНК Полимераза с антителами, ингибирующими активность фермента - TAQ-полимераза; обратная транскриптаза MMLV REVERSE TRANSCRIPTASE.
3. ПЦР буфер — 2,5х буфер: сульфат аммония; Tris base, Tris HCl; трегалоза; Tween-20; хлорид магния.
4. РНК буфер — Деионизованная вода.
5. ПКО-SARS-CoV-2 — рекомбинантная генетическая конструкция — плаزمида.
6. ОКО — Tris-HCl буфер pH 7,5;

7. ВКО — транскрипт assembly protein (mat) гена бактериофага MS2.

3. Характеристики набора реагентов

3.1 Предел обнаружения

Наименьшее число геномных эквивалентов на миллилитр (ГЭ/мл) РНК коронавируса SARS-CoV-2, определяемых с помощью Набора реагентов «ПЦР-КОРОНАВИРУС-SARS-CoV-2-СКРИНИНГ» составляет: 1×10^3 ГЭ/мл РНК коронавируса SARS-CoV-2 в образце НК, прошедшем выделение.

3.2 Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет наличие фрагментов НК из коллекции штаммов.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной НК следующих вирусов и микроорганизмов: *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; вирус парагриппа 1-го типа; вирусы гриппа А и В; аденовирус 5 типа; *Legionella pneumophila*; риновирус типа А, а также геномной ДНК человека и геномной РНК бактериофага MS2.

Аналитическая специфичность набора реагентов дополнительно проверялась *in silico* со следующими инфекционными агентами: SARS-CoV, MERS-CoV, метапневмовирус человека, парагрипп 1-4 типов, респираторный синцитиальный вирус типов А и В.

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов неспецифических реакций выявлено не было. Аналитическая специфичность составила 100% (95%, ДИ: 95-100%)

3.2.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность определяют как процент положительных значений в пробах, где НК коронавируса SARS-CoV-2 присутствует.

Диагностическая чувствительность составила 100% (95%, ДИ: 95-100%)

3.2.2. Диагностическая специфичность

7. ВКО — транскрипт assembly protein (mat) гена бактериофага MS2.

3. Характеристики набора реагентов

3.1 Предел обнаружения

Наименьшее число геномных эквивалентов на миллилитр (ГЭ/мл) РНК коронавируса SARS-CoV-2, определяемых с помощью Набора реагентов «ПЦР-КОРОНАВИРУС-SARS-CoV-2-СКРИНИНГ» составляет: 1×10^3 ГЭ/мл РНК коронавируса SARS-CoV-2 в образце НК, прошедшем выделение.

3.2 Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет наличие фрагментов НК из коллекции штаммов.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной НК следующих вирусов и микроорганизмов: *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; вирус парагриппа 1-го типа; вирусы гриппа А и В; аденовирус 5 типа; *Legionella pneumophila*; риновирус типа А, а также геномной ДНК человека и геномной РНК бактериофага MS2.

Аналитическая специфичность набора реагентов дополнительно проверялась *in silico* со следующими инфекционными агентами: SARS-CoV, MERS-CoV, метапневмовирус человека, парагрипп 1-4 типов, респираторный синцитиальный вирус типов А и В.

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов неспецифических реакций выявлено не было. Аналитическая специфичность составила 100% (95%, ДИ: 95-100%)

3.2.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность определяют как процент положительных значений в пробах, где НК коронавируса SARS-CoV-2 присутствует.

Диагностическая чувствительность составила 100% (95%, ДИ: 95-100%)

3.2.2. Диагностическая специфичность

Диагностическую специфичность определяют как процент отрицательных значений в пробах, где НК коронавируса *SARS-CoV-2* отсутствует.

Диагностическая специфичность составила 100% (95%, ДИ: 95-100%).

3.2.3. Воспроизводимость

Воспроизводимости определяют на идентичных объектах испытаний, разными операторами, на различном оборудовании, с использованием разных серий наборов.

Коэффициент вариации (CV) составил не более 5%.

3.2.4. Повторяемость

Повторяемость определяют на идентичных объектах испытаний, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Коэффициент вариации (CV) составил не более 5%

4. Меры предосторожности

При использовании Набора необходимо использовать средства индивидуальной защиты, например, надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные, возможно содержащие возбудителей любых инфекций.

При работе с Набором реагентов необходимо соблюдать МУ 1.3.2569-09 “Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности”, СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных 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».

При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей в соответствии с ГОСТ Р 52905-2007.

Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

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.

При работе с Набором соблюдать следующие правила: использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.

Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

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

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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».

Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять набор реагентов строго по назначению.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.

Избегать контакта содержимого Набора реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не открывать пробирки после амплификации, чтобы избежать контаминации в лаборатории.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

Набор должен применяться согласно Инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке.

5. Материалы и оборудование

- Амплификатор (например, Rotor-Gene, ДТ-96, CFX96)
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР - «Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).

- Микроцентрифуга-вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2-20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл;
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2; 0,5 и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный;
- Набор для экстракции РНК (см. п.7).

6. Взятие, обработка, транспортирование и хранение исследуемого материала, пробоподготовка.

6.1. Взятие, обработка, транспортирование и хранение исследуемого материала.

Материалом для исследования служат образцы выделенных НК из клинического материала:

- мазков носоглотки и/или ротоглотки;
- мокроты.

При сборе мазков рекомендуется совмещать мазки из носоглотки и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды и исследуются как один образец.

Сбор мазков из носоглотки. Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем его вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После забора материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков.

Сбор мазков из ротоглотки. Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой. После забора материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков.

Взятие мокроты осуществляют в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8°C – в течение 2 суток;
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°C – длительно.

Для контроля эффективности экстракции НК и возможного ингибирования ПЦР в составе Набора реагентов предусмотрено наличие внутреннего контроля ПЦР (ВКО). По окончании реакции амплификации наличие сигнала по каналу Cy5 в исследуемых образцах, свидетельствует о накоплении фрагментов РНК внутреннего контроля и говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

6.2. Пробоподготовка.

Содержимое мазков перед экстракцией НК следует перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5-10 сек при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Перед выделением нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение мокроты, используя раствор «Муколизин». В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 («Муколизин»:мокрота), ориентируясь по градуировке емкости. В процессе разжижения мокроты (20–30 минут) емкость периодически встряхивают. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты и центрифугируют при 5000–7000 g (8000–10000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут. Удаляют 0,8 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,2 мл оставшейся жидкости и используют в выделение. Допускается выделение РНК из 0,1 мл разжиженной мокроты без стадии центрифугирования

Таблица 4. Рекомендуемые транспортные среды.

Исследуемый материал	Транспортная среда
Мазки из ротоглотки и носоглотки, мокрота	АмплиСенс «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»; АмплиСенс «Транспортная среда для мазков».

7. Проведение анализа

Экстракция РНК из клинических образцов может осуществляться комплектами реагентов, подходящими для экстракции специфической РНК из клинического материала (мокрота, мазки из ротоглотки и носоглотки), зарегистрированными на территории РФ и/или рекомендованными Роспотребнадзором. В процессе экстракции используют ВКО, добавляя его в начале выделения в количестве 10 мкл на 1 образец.

Исследование с помощью Набора состоит из следующих этапов:

- приготовление реакционных смесей;

- подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ;
- проведение ОТ-ПЦР-РВ;
- интерпретация результатов анализа.

7.1. Приготовление реакционных смесей

ВНИМАНИЕ! Компоненты Набора реагентов после вскрытия выдерживают 10 циклов размораживания/замораживания, считая с первого использования. Необходимо учитывать данный факт при планировании количества экспериментов с использованием Набора.

ВНИМАНИЕ! Смесь ферментов RT PCR ENZ. рекомендуется извлекать из морозильной камеры непосредственно перед приготовлением реакционных смесей. Осадить капли смеси ферментов с крышки перед использованием кратковременным центрифугированием на вортексе. После внесения RT PCR ENZ. в реакционную смесь, ее следует сразу убрать в морозильную камеру. РЕКОМЕНДУЕМ переносить пробирку с RT PCR ENZ. с использованием штатива-охладителя.

ВНИМАНИЕ! После внесения смеси ферментов RT PCR ENZ. готовые реакционные смеси не подлежат хранению, после использования остатки реакционных смесей должны быть утилизированы.

Разморозить при комнатной температуре (от 18 до 25°C) реагенты для амплификации (ПЦР-смесь-SARS-CoV-2, ПЦР-буфер, РНК буфер, ПКО-SARS-CoV-2, ОКО).

Приготовление реакционной смеси.

В отдельной пробирке смешать компоненты из расчета на каждую реакцию:

- 5 мкл ПЦР-смесь-SARS-CoV-2;
- 10 мкл ПЦР-буфера;
- 0,75 мкл RT PCR ENZ

Перемешать смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.

Приготовление реакционной смеси следует проводить при комнатной температуре от 18 до 25°C в течение не более 1,5 часов.

7.2. Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ

ВНИМАНИЕ! Компоненты Набора реагентов после вскрытия выдерживают 10 циклов размораживания/замораживания, считая с первого использования. Необходимо учитывать данный факт при планировании количества экспериментов с использованием Набора.

Отобрать необходимое количество пробирок для проведения амплификации исследуемых образцов и контролей, промаркировать их.

Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси (п.7.2).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл РНК-буфера;
- б) в пробирку положительного контроля ПЦР – 10 мкл ПКО-SARS-CoV-2.
- в) в остальные пробирки – по 10 мкл исследуемых образцов (включая выделенный образец ОКО).

ВНИМАНИЕ! Если детекция флуоресцентного сигнала амплификатором производится через крышки пробирок, в этом случае запрещается маркировать крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ! В случае использования приборов планшетного типа (таких как: «ДТ-96», «CFX96», LightCycler® 96 и прочие) необходимо осадить капли со стенок пробирок (или плашек) кратким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после добавления исследуемых проб и контролей в реакционные смеси.

7.3. Проведение ОТ-ПЦР-РВ

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя.

Параметры температурно-временного режима амплификации указаны в Таблице 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации

п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 15 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 10 сек	10
	56°C – 10 сек	
	72°C – 10 сек	
4	95°C – 10 сек	30
	56°C – 10 сек, детекция ROX(Orange)/Cy5(Red)	
	72°C – 10 сек	

Учет результатов ПЦР-анализа по всем каналам проводится в соответствии с параметрами, представленными в таблице 6.

Таблица 6. Параметры обработки результатов анализа.

Амплификатор	Конечный цикл (КЦ)	Параметры обработки результатов
Rotor-Gene	30	• «Dynamic tube»/«Динамич.фон» • «Slope Correct»/«Коррект. уклона» • «Outlier Removal»/«Устранение выбросов» - 15% • Threshold – 0,05
ДТ-96	30	• Тип анализа «Мультиплекс» • Метод – «Геометрический (Cp)» • «Критерии достоверности данных»: нижняя граница – 5%, верхняя граница – 30%
CFX96	30	• Baseline Threshold – на уровне 10-20% от максимального уровня флуоресценции образца К+

На амплификаторе Rotor-Gene в режиме Анализа для каждого из каналов детекции необходимо включить функции «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррект. уклона» и установить

«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» - 15%, а также установить величину Threshold – 0,05.

На амплификаторе ДТ-96 необходимо выбрать тип анализа «Мультиплекс», метод – «Геометрический (Ср)». В разделе «Изменить параметры анализа» в «Критерии достоверности данных» ввести: Нижняя граница/порог положительного результата - 5%, верхняя граница/порог нормализации данных - 30%. «Критерий положительного результата ПЦР» и «Величина Threshold» устанавливаются автоматически (90% и 10 соответственно).

На амплификаторе CFX96 установить пороговую линию на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой).

7.4. Интерпретация результатов анализа.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору. Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

При проведении качественного ПЦР-анализа используется принцип интерпретации результатов представленный в таблице 7.

Таблица 7. Оценка результатов анализа

Проба	Диапазон Ct по каналу		Результат
	ROX	Cy5	
	НК-мишень		
	Nucleocapsid protein (N) gene <i>SARS-CoV-2</i>	Assembly protein (mat) ген бактериофага MS2	
ПКО	до 24	до 24	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
РНК буфер	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
	Сигнал отсутствует	Любое значение	Контаминация геномной РНК бактериофага MS2! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!
ОКО	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 26	Экстракция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >26	Результат не достоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Клинические образцы	Любое значение от 1 до 24	Сигнал отсутствует или любое значение от 1 до 26	Результат анализа положительный. РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена
	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 26	Результат анализа отрицательный
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >26	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

ВНИМАНИЕ! Результат ПЦР-анализа считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей амплификации (ПКО-SARS-CoV-2, РНК буфер) и контроля выделения (ОКО).

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct ROX (Orange) – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор ROX) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct Cy5 (Red) – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного специфического сигнала или сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор Cy5) с пороговой линией.

Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля К- (PHK буфер) и для контроля экстракции ОКО (на канале ROX/Orange) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

Образцы, для которых по каналу Cy5 (Red) значение Ct отсутствует (и при этом по каналу ROX (Orange) отсутствует значение Ct) являются недостоверными и требуют повторного проведения исследования.

Образец считается положительным (PHK коронавируса SARS-CoV-2 присутствует) если наблюдается экспоненциальный рост сигнала на канале ROX (Orange), при этом значения Ct контрольных образцов находятся в пределах нормы.

Образец считается отрицательным (PHK коронавируса SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) отсутствует) если не наблюдается рост специфического сигнала на канале ROX (Orange), при этом значения Ct по каналу Cy5 (Red) и Ct контрольных образцов находятся в пределах нормы.

Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения Ct для которых лежат в указанном диапазоне.

8. Контаминация

НК инфекционных агентов (коронавируса SARS-CoV-2) не должна выявляться в отрицательном контроле. Присутствие НК инфекционных агентов (коронавируса SARS-CoV-2) в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время приготовления образцов или во время подготовки к проведению исследования.

Для того чтобы избежать контаминации, необходимо произвести полную обработку лаборатории в соответствии с МУ-1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»; затем повторно провести анализ.

9. Контроль качества

Контроль качества Набора при изготовлении осуществляет ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 21.10.60-009-92463794-2021.

10. Условия хранения и транспортирования

Информация об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) данного изделия.

Набор следует хранить на складах при температуре от минус 24 до минус 16°C вдали от прямых солнечных лучей в течение всего срока годности набора. После транспортирования во избежание возможной кросс-контаминации Набор должен быть разукomплектован. Реагенты для амплификации хранить отдельно от Контролей.

Хранение изделий ниже 0°C должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Срок годности Набора реагентов – 12 месяцев с даты производства. Вскрытые реагенты использовать до истечения срока годности набора.

Хранение светочувствительных изделий должно осуществляться в темном месте.

Транспортирование Набора реагентов производится всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при соблюдении температурного режима. Для всех вариантов исполнения Набора реагентов допустима транспортировка:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение 30 дней;

- при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 суток.

Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения "Холодовой цепи", обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Ремонту и обслуживанию не подлежит.

11. Условия эксплуатации

- Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

- Готовая к работе реакционная смесь хранению не подлежит, ее остатки должны быть утилизированы.

- Рекомендуемые условия окружающей среды для использования Набора реагентов:

- температура воздуха 20-28°C
- относительная влажность 45-75%
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.)

- Приготовление реакционной смеси следует проводить при комнатной температуре от 18 до 25°C и влажности и относительной влажности не более 75% в течение не более 1,5 часов.

12. Ограничения метода

- Только для диагностики *in vitro*.

- При возникновении мутаций в исследуемой области генов, может снижаться интенсивность анализируемого сигнала или возникать ложноотрицательные реакции.

- Результаты анализа с использованием Набора реагентов должны интерпретироваться в сочетании с другими клинико-диагностическими и анамнестическими данными.

- Для получения корректного результата важно использовать образцы для анализа на тестирование данных возбудителей до начала приема антибиотикотерапии или после окончания всего курса в случае оценки эффективности лечения.

Влияние интерферирующих веществ.

Эффективность Набора не снижается при применении следующих медицинских препаратов:

Таблица 8. Исследуемые образцы интерферентов

Название	Допустимая концентрация
Хлоргексидин	0,005 мг/мл
Муцин	40%
Гемоглобин человека	0,3 мг/мл

13. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

14. Утилизация

Утилизации подлежат все Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности.

Медицинские отходы класса В. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологические отходы следует утилизировать в соответствии со схемой, принятой в организации, в соответствии с 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».

Утилизация производится специальными организациями, имеющими лицензию на право утилизации медицинских отходов.

15. Гарантии изготовителя и сведения о рекламациях

ООО «СКРИНИНГ-М» гарантирует стабильность Наборов на протяжении всего срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

По вопросам, касающимся качества Наборов, следует обращаться в ООО «СКРИНИНГ-М» по адресу: 105005, г. Москва, Бауманская ул., д. 7, стр. 1, .Антресоль 2, пом 1, комн. 17, оф.95, тел./факс (495)956-75-85, e-mail: skrining-m@yandex.ru, www.скрининг-м.рф.

Место производства: 108841, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная, д.2.

16. Используемые символы

	Изготовитель		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

	Версия инструкции по применению		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления

17. Перечень применяемых производителем медицинского изделия национальных стандартов

Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012, ГОСТ Р 51088-2013, ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015, ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015, ГОСТ Р ИСО 23640-2015, ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020, ГОСТ Р ЕН 13612-2010, ГОСТ ISO 17511-2011, СанПиН 2.1.7.1322-03, СанПиН 2.1.3684-21

Список литературы

1. МУ 1.3. 2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2009. - 42 с.
2. СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)
3. Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 11 от 07.05.2021 г.
4. Временные рекомендации по организации лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV) (письмо Роспотребнадзора от 21 января 2020 года N 02/706-2020-27).

5. Инструкция об организации работы по диагностике новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (письмо Роспотребнадзора от 18.03.2020 №02/4457-2020-27).
6. ПЦР в реальном времени. Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Саматов Г.А. // М.: Лаборатория знаний, 2019. - 223 с.
7. Wang Chen, Horby Peter W, Hayden Frederick G, Gao George F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*. 2020;395(10223):470–473. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
8. Coronavirus Outbreak. Available at: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>. Accessed 23 Feb 2020
9. Chan-Yeung M, Xu RH. SARS: epidemiology. *Respirology*. 2003;8:S9–14. doi: 10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x.
10. <https://russian.rt.com/world/news/727461-voz-obyavila-pandemiyu>
11. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report - 38. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200227-sitrep-38-covid-19.pdf?sfvrsn=9f98940c_2 (Accessed on 28th Feb 2020) 2020.
12. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol*. 2016;24:490–502.
13. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*. 2003;362:1353–8.
14. Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJ, van den Hoogen BG. et al. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*. 2003;423:240.

Пронумеровано, прошито и скреплено печатью
ООО «СКРИНИНГ-М»

На 25 листах (двадцати пяти)

Генеральный директор:

/ Груздева О.А.

