



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
«20» мая 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для выявления РНК
вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В
методом ОТ-ПЦР-РВ
«CoV-Influ-тест»**

ТУ 21.20.23-026-97638376-2020

Содержание

Введение.....	3
1. Назначение.....	4
2. Принцип метода	5
3. Состав набора реагентов	7
4. Характеристики набора реагентов.....	9
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	15
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	15
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	18
8. Анализируемые образцы	19
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	24
10. Проведение анализа	25
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	27
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	30
13. Утилизация	31
14. Гарантийные обязательства, контакты	32
Приложение А.....	33
Приложение Б	36

Введение

Диагностирование вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В крайне актуально для правильной и своевременной постановки диагноза и назначения лечения при симптомах ОРВИ.

Целевые аналиты: специфичные участки геномной РНК коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2), вируса гриппа А (Influenza A virus, IAV) и вируса гриппа В (Influenza B virus, IBV).

Научная обоснованность целевого аналита: заключается в специфичности целевого аналита (уникальности последовательности РНК) в отношении геномов выявляемых вирусов.

В качестве мишени для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 используются высококонсервативные фрагменты генов *N* и *RdRp* (open reading frame lab, *ORF1ab*). Одновременное выявление двух мишеней позволяет уменьшить вероятность получения ложноотрицательных результатов в связи с высоким молекулярно-генетическим полиморфизмом SARS-CoV-2 (включая линии B.1.1.7, B.1.617, B.1.351, P.1 и P.2 (www.gisaid.org)). Мишень для выявления РНК вируса гриппа А – фрагмент гена *M1* (matrix gene)¹. Используемая мишень позволяет выявлять все известные штаммы вируса, включая H1N1, H3N2, H5N1, H7N9, H9N2, H10N8, но не дифференцируя их. Мишень для выявления РНК вируса гриппа В – фрагмент гена *NP* (nucleoprotein gene)¹.

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «CoV-Influ-тест» рекомендуется применять для пациентов с респираторными заболеваниями с подозрением на инфицирование коронавирусом: вирусом гриппа А (Influenza A virus, IAV) или вирусом гриппа В (Influenza B virus, IBV) для уточнения этиологии заболевания и выбора соответствующей противовирусной терапии, прогностической оценки течения заболевания и возможных осложнений.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

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

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «CoV-Influ-тест» предназначен для качественного выявления специфичных участков геномной РНК коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2), вируса гриппа А (Influenza A virus, IAV) и вируса гриппа В (Influenza B virus, IBV) методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе РНК, выделенной из клинического материала человека (мазки из носоглотки, мазки из ротоглотки, мокрота), у пациентов с подозрением на инфицирование коронавирусной инфекцией (SARS-CoV-2), вирусом гриппа А или В для уточнения этиологии заболевания и выбора соответствующей противовирусной терапии, прогностической оценки течения заболевания и возможных осложнений.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для диагностики респираторных заболеваний, вызванных вирусами SARS-CoV-2 и вирусами гриппа А и В.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

В соответствии с п. 3.4. Методических рекомендаций МР 3.1.0170-20 «Эпидемиология и профилактика COVID-19»: «Первичные скрининговые исследования без выделения могут проводиться на базе лабораторий, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями

¹ WHO information for the molecular detection of influenza viruses. July 2017

инфекционных болезней III-IV групп патогенности, при этом к работе допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие подготовку/инструктаж по вопросам обеспечения требований биологической безопасности, проведенный сотрудниками организации и учреждении Роспотребнадзора осуществляющих деятельность с возбудителями инфекционных болезней II группы патогенности (работа по проведению таких инструктажей организуется на территориальном уровне путем сбора обращений, формирования учебных групп при согласовании территориальных органов Роспотребнадзора)».

2. Принцип метода

Метод

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

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы РНК выделенные из клинического материала человека: мазки и носоглотки, мазки из ротоглотки, мокрота.

Получение биологического материала, пробоподготовка, хранение, последующее обезвреживание и утилизация должны осуществляться согласно инструктивно-методическим документам регламентирующим выполнение исследований для возбудителя инфекции COVID-19, инструкции к набору реагентов и в соответствии с СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" и Временными методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19».

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

Принцип определения

Качественное выявление специфичных участков геномной РНК вируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В методом мультиплексной одностадийной реакции обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробе РНК, выделенной из клинического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;

2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

3. Интерпретация результатов.

С пробами РНК проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

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

В составе смеси олигонуклеотидов присутствуют праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридуется с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и гидролизуются (разрушаются) *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушителе, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции по соответствующему диапазону оптического спектра. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов <i>N</i> и <i>RdRp</i>)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена <i>М1</i>)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена <i>NP</i>)

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения РНК и определить наличие возможных ингибиторов обратной транскрипции и амплификации в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

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

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истекшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Время проведения ОТ-ПЦР составляет от 100 до 125 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» выпускается в одной форме комплектации.

Количество анализируемых проб

Набор реагентов (табл. 2), рассчитан на 96 реакций, что соответствует определению 94 исследуемых образцов: отрицательных и положительных контрольных образцов при единичном запуске амплификатора на 96 лунок или 32 единичных

постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Таблица 2 – Состав набора реагентов «CoV-Influ-тест»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1.	ОТ-ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2.	Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 480 мкл
3.	Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
4.	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1 600 мкл
5.	Внутренний контрольный образец (ВКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл

Состав набора

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

Смесь олигонуклеотидов готова к использованию и содержит праймеры и зонды, предназначенные для выявления специфических мишеней (табл. 1).

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: специфичные фрагменты кДНК генов *N* и *RdRp* вирусов новой коронавирусной инфекции, гена *М1* вируса гриппа А и гена *NP* вируса гриппа В и ВКО.

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

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

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

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «CoV-Influ-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		
1. Внешний вид		1
ОТ-ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7. пункт 7.6
Смесь олигонуклеотидов	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7. пункт 7.6
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7. пункт 7.6
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7. пункт 7.6
Внутренний контрольный образец (ВКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7. пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-026-97638376-2020	Раздел 7. пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-026-97638376-2020	Раздел 7. пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-026-97638376-2020	Раздел 7. пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
2.1 Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM, ROX и Cy5 $Ct \leq 30$, по каналу HEX ≤ 32	Раздел 7. пункт 7.8.2
2.2 Отрицательный результат с ОКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ОКО по каналам FAM, ROX и Cy5 значение $Ct > 35$ или отсутствует, по каналу HEX ≤ 32	Раздел 7. пункт 7.8.2

3 Прохождение реакции в пробирках КОС	В пробирках с КОС Ct по каналам FAM, ROX и Cy5 не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX $Ct \leq 32$.	Раздел 7. пункт 7.8.2
4 Прохождение реакции в пробирках КОЧ	В пробирках с КОЧ-1 по каналу FAM во всех повторях (не менее 3) $Ct \leq 35$, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует. В пробирках с КОЧ-2 по каналу FAM во всех повторях (не менее 3) $Ct \leq 35$, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует. В пробирках с КОЧ-3 по каналу ROX во всех повторях (не менее 3) $Ct \leq 35$, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует. В пробирках с КОЧ-4 по каналу Cy5 во всех повторях (не менее 3) $Ct \leq 35$, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.	Раздел 7. пункт 7.8.2

4.2. Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к фрагментам РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В и внутреннему контрольному образцу. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце геномной НК следующих организмов и вирусов в концентрации до 10^7 копий/мл:

Bordetella parapertussis, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Betacoronavirus 1* OC43, *Bordetella bronchiseptica*, *Quantitative Synthetic Human coronavirus NL63 RNA*, *Haemophilus influenza*, *Respiratory syncytial virus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Human rhinovirus*, *Staphylococcus aureus*, *Human parainfluenza virus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Human adenovirus*, *Legionella pneumophila*, *Human metapneumovirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Human coronavirus 229E*.

4.2.2 Аналитическая чувствительность: обнаружения

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений с использованием Стандартного образца предприятия СОП, представляющего смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемого фрагмента геномной ДНК коронавируса SARS-CoV-2 (плазида pNCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл и плазида pRdCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа А (плазида pIAV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа В (плазида pIBV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл) и фрагмента генома бактерии *Escherichia coli* (плазида pMS2 с концентрацией 1×10^5 копий/мл) в 100 % буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

Исследование проводили с использованием 7 разведений в диапазоне предполагаемого предела обнаружения набора «S-реактивов»: 500 копий/мл, 600 копий/мл, 700 копий/мл, 800 копий/мл, 900 копий/мл, 950 копий/мл, 1000 копий/мл.

Каждое из 7 разведений анализировали с помощью набора «CoV-Influ-тест» в течение 3 разных дней в 30 повторах для каждого разведения. Результаты определялись в процента положительных результатов. Результаты определялись в соответствии с международными рекомендациями CLSI EP-17-A2 пробит-анализом.

В соответствии с рекомендациями документа CLSI EP-17-A2 использование пробит-анализа проводилось статистическая обработка полученных результатов. Для расчета пределов обнаружения концентрации РНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вируса гриппа А и вируса гриппа В с доверительной вероятностью 95% использовалось пробит-значение (ось Y) 6.64 (1.64 для предела обнаружения +5 для пробит-шкалы).

По результатам исследования:

- предел обнаружения РНК SARS-CoV-2 с частотой выявления 95 % – для амплификатора ДТпрайм – 983 копий/мл (95%ДИ: 981.57-984.43), CFX 96 – 960 копий/мл (95%ДИ: 958.57-961.43), Rotor-Gene Q – 966 копий/мл (95%ДИ: 966.57-969.4), Quant Studio 5 – 966 копий/мл (95%ДИ: 964.57 – 967.43).

- предел обнаружения (LOD) РНК вируса гриппа А частоты выявления 95 % – для амплификатора ДТпрайм – 950 копий/мл (95%ДИ: 948.57-951.43), CFX 96 – 992 копий/мл (95%ДИ: 990.57-993.43), Rotor-Gene Q – 961 копий/мл (95%ДИ: 959.57-962.43), Quant Studio 5 – 974 копий/мл (95%ДИ: 972.57 – 975.43).

- предел обнаружения (LOD) РНК вируса гриппа В частоты выявления 95 % – для амплификатора ДТпрайм – 995 копий/мл (95%ДИ: 993.57-996.43), CFX 96 – 970 копий/мл (95%ДИ: 968.57-971.43), Rotor-Gene Q – 966 копий/мл (95%ДИ: 964.57-967.43), Quant Studio 5 – 968 копий/мл (95%ДИ: 966.57 – 969.43).

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, контрольные образцы чувствительности и специфичности были исследованы по 10 повторов.

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

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов. Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%.

4.2.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

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

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 10%.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было отобрано 65 образцов мазков из ротоглотки, 62 образца мазков из носоглотки, 55 образцов мокроты, содержащих исследуемые РНК коронавируса, инфекции SARS-CoV-2, вируса гриппа А и вируса гриппа В, а также для оценки перекрестной реактивности образцы, не содержащие исследуемые аналиты, но с подтвержденным положительным наличием возбудителей респираторных инфекций (респираторный синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы).

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

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

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «CoV-Influ-тест» каждым вариантом исполнения, производства ООО «ТестГен». В условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутрисерийная, межсерийная и межсерийная воспроизводимость.

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

Диагностические характеристики испытываемого набора в отношении к каждому исследуемому аналиту в образцах клинического материала человека (мазки из носоглотки, мазки из ротоглотки, мокрота) приведен в Таблице 4

Таблица 4

Вид исследуемого материала	Исследуемый аналит	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазки из ротоглотки	РНК SARS-CoV-2	44	88	100% (95% ДИ: 92,89%-100%)	100% (95% ДИ: 95,89%-100%)
	РНК вируса гриппа А	54	108	100% (95% ДИ: 88,43%-100%)	100% (95% ДИ: 96,64%-100%)
	РНК вируса гриппа В	59	118	100% (95% ДИ: 83,16%-100%)	100% (95% ДИ: 96,92%-100%)
Мазки из носоглотки	РНК SARS-CoV-2	40	80	100% (95% ДИ: 93,15%-100%)	100% (95% ДИ: 93,15%-100%)
	РНК вируса гриппа А	54	108	100% (95% ДИ: 85,75%-100%)	100% (95% ДИ: 96,64%-100%)
	РНК вируса гриппа В	57	114	100% (95% ДИ: 81,47%-100%)	100% (95% ДИ: 96,82%-100%)
Мокрота	РНК SARS-CoV-2	39	78	100% (95% ДИ: 91,19%-100%)	100% (95% ДИ: 95,38%-100%)
	РНК вируса гриппа А	48	96	100% (95% ДИ: 84,56%-100%)	100% (95% ДИ: 96,23%-100%)
	РНК вируса гриппа В	50	100	100% (95% ДИ: 81,47%-100%)	100% (95% ДИ: 96,38%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;

2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;

3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой РНК содержимым из пробирки ПКО или продукта амплификации;

4. Проведение анализа с использованием пробы РНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);

5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;

6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2» (вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест») является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

Лабораторные исследования для обнаружения возбудителя COVID-19, отнесенного ко II группе патогенности, должны проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к профилактике инфекционных болезней».

Требования к помещению и оборудованию при проведении специфической лабораторной (этиологической) диагностики COVID-19 соответствуют вышеприведенным санитарным правилам

правилам, изложенным в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для предотвращения перекрестной контаминации образцов амплифицированными продуктами рабочие зоны для выделения РНК и проведения МАНК с обратной транскрипцией и учета ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции должны быть расположены в отдельных помещениях, удаленных друг от друга.

Лаборатория должна иметь оборудование, достаточное для проведения МАНК для диагностики COVID-19, с учетом применяемых методов и объема работы.²

Лаборатория должна иметь СИЗ (одноразовая защитная одежда IV типа, маски, респираторы, защитные очки, одноразовые перчатки (резиновые) и др.) в достаточных количествах в соответствии с СанПиН 3.3686-21, включающих необходимое количество комплектов для каждой рабочей зоны, возможность смены СИЗ в течение дня, запас СИЗ, обеспечивающий бесперебойное обеспечение персонала.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 1.3.287-113), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

² Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)" Утв. Минздравом России)

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы 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);

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;

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации для работы с ПБА I–II групп патогенности и по ПЦР-диагностике, атак же лаборант со средним специальным медицинским образованием);

- не использовать набор по истечении срока годности;
- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой; при контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

Реагент ВКО содержит азид натрия в концентрации, превышающей 0,1 %. Данный реагент не классифицируется как

опасный, не требует специальных мер предосторожности и не подлежит специальной маркировке в соответствии с ГОСТ 31340-2013.

Реагенты, входящие в набор «CoV-Influ-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «CoV-Influ-тест», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с набором реагентов осуществляется в рабочей зоне 3 для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам AM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

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

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Axugen, США);

2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) и оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенки пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл, и пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, Axugen, США), совместимые с используемым амплификатором;

4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл;

7. Набор для выделения РНК из клинического материала (с п. 8.2).

8. Для взятия мазка из носоглотки и ротоглотки рекомендуют использовать «Зонд медицинский одноразовый стерильный по 32.50.13-002-28731857-2020», производства ООО «ФармМедПолимер», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/13989 от 26.11.2021).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для исследования являются пробы РНК, выделенные из клинического материала человека: мазки из носоглотки, мазки из ротоглотки, мокрота.

8.1. Процедура получения клинического материала

ВНИМАНИЕ! Забор диагностического материала, его упаковка, маркировка и транспортировка осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранении и транспортировки согласно МУ 1.3.25.2019.

09 "Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности" и Методическими рекомендациями Роспотребнадзора МР 3.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19".

Медицинский работник, выполняющий забор диагностического материала, его маркировку и упаковку, должен пройти инструктаж по санитарно-эпидемиологическим требованиям и правилам биологической безопасности при работе с пациентами, потенциально инфицированными микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Мазок с носоглотки

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

Мазок из ротоглотки

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

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

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

Мокрота

Мокрота собирается в одноразовый стерильный пластиковый контейнер объемом 30-50 мл, герметично закрывающийся винтовой пробкой. Диаметр горлышка контейнера должен быть не менее 30 мм. Необходимо убедиться, что собранный материал представляет собой мокроту (отделяемое нижних

дыхательных путей).

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

Температура при транспортировке должна быть $+2^{\circ} - +8^{\circ} \text{C}$.
Время хранения образцов до исследования не должно превышать дней при $+2^{\circ} - +8^{\circ} \text{C}$, может быть больше при -20°C или -70°C .

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

При необходимости пересылки образцов в лабораторию другого медицинского учреждения выполняются требования к пересылке инфекционных материалов II группы патогенности (С 1.2.036-95 "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности").

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

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

Пакет с контейнерами помещают в герметично закрывающийся контейнер для транспортировки биологических материалов. Контейнер помещают в пенопластовый термоконтейнер с охлаждающими термоэлементами. Транспортный контейнер опечатывается и маркируется. В контейнер желательно поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение температуры от $+2^{\circ}$ до $+8^{\circ} \text{C}$.

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

8.2 Выделение РНК из клинического материала

Для выделения пробы РНК из клинического материала человека (мазки из носоглотки, мазки из ротоглотки, мокрота) рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

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

К каждому исследуемому образцу следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «CoV-Influ-тест».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения РНК в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя для выделения РНК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Условия возможного хранения анализируемых препаратов РНК:

- при температуре от 2°C до 8°C не более 4 ч (рекомендуется),
- при температуре от минус 24°C до минус 16°C не более недели,
- при температуре не выше минус 68°C не более года.

8.3. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «CoV-Influ-тест» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут естественным образом присутствовать в респираторных образцах или которые могут быть искусственно введены в носовую полость, носоглотку или ротоглотку.

Концентрации интерферирующих веществ, которые могут встречаться и которые не влияют на результаты теста указаны в таблице 5.

⁴ "Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 13.1 (17.11.2020) (утв. Минздравом России)"

Таблица 5

Тип	Вещество	Активный компонент	Концентрация	Результат	
				Ложноположительные результаты	Ложноотрицательные результаты
Эндогенные	Биологические агенты	Муцин	2% мас/об	0/3	0/3
		Гемоглобин	1% об/об	0/3	0/3
Экзогенные	Безрецептурные капли для носа	Фенилэфрин	15% об/об	0/3	0/3
	Безрецептурный гель для носа	Хлорид натрия	5% об/об	0/3	0/3
	Безрецептурный спрей для носа1	Кромолин	15% об/об	0/3	0/3
	Безрецептурный спрей для носа2	Оксиметазолин	15% об/об	0/3	0/3
	Безрецептурный спрей для носа3	Флуконазол	5% мас/об	0/3	0/3
	Леденец от боли в горле	Бензокаин, Ментол	0,15% мас/об	0/3	0/3
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа1	Гальфимия глаука, Сабадилла	20% об/об	0/3	0/3
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа2	Глюконат цинка	5% мас/об	0/3	0/3
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа3	Алкалол	10% об/об	0/3	0/3
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа4	Флутиказона пропионат	5% об/об	0/3	0/3
	Спрей от боли в горле с фенолом	Фенол	15% об/об	0/3	0/3
	Противовирусный лекарственный препарат	Тамифлю (фосфат осельтамивира)	0,5% об/об	0/3	0/3
	Антибиотик. мазь для носа	Мупироцин	0,25% об/об	0/3	0/3
	Антибактериальное, системное	Тобрамицин	0,0004% мас/об	0/3	0/3

На основании результатов исследования, потенциально интерферирующие вещества, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «CoV-Influ-тест» не оказывают интерферирующего воздействия.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);
- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

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

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

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

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

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

9. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции.

Для приготовления реакционной смеси необходимо:

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

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+3) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.

3. В подготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.

5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО прошедший этап выделения НК.

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

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

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

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 6.

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

Таблица 6 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
4	95	00:15		45
	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	

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

3. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.

4. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

5. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10–20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 1). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 6).

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификаторов Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene Q и аналогичных активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для ОКО и ПКО должны быть получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Значения C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 7, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов

Принципы интерпретации результатов отражены в таблице 8.

Если для образца регистрируется рост флуоресценции специфического продукта по каналам FAM/Green, ROX/Orange или Cy5/Red раньше 12 цикла ($C_t < 12$), то это говорит о высокой первоначальной концентрации РНК соответствующего вируса. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата для вируса, РНК которого присутствует в низкой концентрации. Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ОТ-ПЦР/ПЦР выделенного препарата РНК или использование наборов реагентов для отдельного выявления РНК соответствующих вирусов.

Таблица 8 – Принцип интерпретации результатов

Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам (в скобках указаны целевые аналиты)				Результат
FAM / Green (SARS-CoV-2)	ROX / Orange (вирус гриппа A)	Cy5 / Red (вирус гриппа B)	HEX / Yellow (BKO)	
–	–	–	≤ 32	РНК вируса SARS-CoV-2, вируса гриппа A и вируса гриппа B не обнаружена
–	–	–	> 32	результат невалидный
≤ 35			не уч.	обнаружена РНК вируса, соответствующая каналу
> 35			не уч.	результат теста сомнительный для мишени, соответствующей каналу

Обозначения: «не уч.» – результат при интерпретации не учитывается; «!» – сигнал флуоресценции отсутствует.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация НК, присутствие ингибиторов в препарате НК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ОТ-ПЦР и др.

Причиной получения сомнительного результата может служить маленькая концентрация вируса в клиническом образце.

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

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 до 8 °С не более 30 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «CoV-Influ-тест» не более 10 раз.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

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

Транспортирование

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

Транспортировать при температуре от минус 18 до минус 22 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 30 суток, или при температуре от 15 до 25 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

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

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «CoV-Influ-тест» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении

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

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 22 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

12. Утилизация

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

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

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113).

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

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

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

13. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «CoV-Influ-тест» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

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

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),

432072, г. Ульяновск, 44-й Инженерный проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ 15150-69	Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
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 18321-73	Статистический контроль качества. Методы случайного отбора выборок штучной продукции
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
ГОСТ 7625-86	Бумага этикеточная. Технические условия
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ 12.1.005-88	Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ Р 8.657-2016	Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Фотометрия импульсная. Термины и определения
	Номенклатурная классификация медицинских изделий по видам, утвержденная приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н (в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении

	номенклатурной классификации медицинских изделий»).
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия
ГОСТ Р 2.601-2019	Единая система конструкторской документации. Эксплуатационные документы
ГОСТ 8.417-2002	Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы величин
Приказ МЗ РФ от 19 января 2017 г. N 11н	"Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинского изделия"

Символы маркировки

Символ	Наименование символа
	Использовать до
	Дата изготовления
	Код партии
	Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для 94 определений
	Медицинское изделие для диагностики in vitro

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

20 (двадцать) листов

Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.





УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«15» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Стандартный образец предприятия
Контрольный образец для определения
чувствительности (КОЧ-1)**

Только для проведения испытаний

*Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов
гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»*

Содержание

1. Назначение	4
2. Принцип метода	5
3. Состав КОЧ-1	6
4. Технические и функциональные характеристики	6
6. Меры предосторожности при работе	7
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	9
8. Процедура подготовки КОЧ-1 для исследования	10
9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-1	10
10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»	10
11. Регистрация и интерпретация результатов	14
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОЧ-1	16
13. Утилизация	16

1. Назначение

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-1 предназначен для использования в качестве контрольного образца при проведении контроля качества «Набора реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»» в соответствии ТУ 21.20.23-026-97638376-2020, а также для оценки аналитической чувствительности, прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости набора реагентов «CoV-Influ-тест» при проведении валидации функциональных характеристик, а также в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-1, представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pNCV2-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

Предназначенный пользователь: инженер ТК ООО «ТестГен», в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудник отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудник испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

2. Принцип метода

Метод

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

Принцип метода

Контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ-1) проходит все этапы исследования (выделение НК, мультиплексную одностадийную реакцию обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)).

С пробами НК, выделенными из Контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ-1), с использованием набора реагентов «CoV-Influ-тест» проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

3. Состав КОЧ-1

Таблица 2 – Состав КОЧ-1

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	КОЧ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1000 мкл

4. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики КОЧ-1.

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
КОЧ-1	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Функциональные характеристики	
1. Концентрация	Смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pNCV2-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА)
2. Прохождение ПЦР-реакции	В пробирках с КОЧ-1 по каналу FAM Ct ≤ 35, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.

Примечание: Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

Метрологическую прослеживаемость КОЧ-1

Прослеживаемость до стандартных образцов производится путем параллельного тестирования контрольного образца для определения чувствительности КОЧ-1 с международным стандартом «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146 в различных концентрациях. На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации образца КОЧ-1 до Международного стандарта «Первый

Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146 можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-1 в отношении фрагмента гена N РНК вируса SARS-CoV-2 составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-1 составляет -0,15.

6. Меры предосторожности при работе

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-1 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-1 и деградации плазмидных ДНК.

Все составные части и реагенты, входящие в состав КОЧ-1, относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в КОЧ-1, обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в КОЧ-1, не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

Работа должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы 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»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе только сотрудников ООО «ТестГен» инженера ТК, в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудников отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудников испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест», с соблюдением мер предосторожности;

- не использовать КОЧ-1 по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

В составе КОЧ-1 отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с КОЧ-1 и набором реагентов «CoV-Influ-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК (см. п. 9).

8. Процедура подготовки КОЧ-1 для исследования

КОЧ-1 готов к применению и представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pNCV2-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-1 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-1 и деградации плазмидных ДНК.

9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-1

Выделение пробы НК проводят из 100 мкл исследуемого образца СОП с использованием следующего комплекта для экстракции:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019. производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.).

10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»

Подготовка компонентов набора «CoV-Influ-тест» для ПЦР

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.
2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: 1 х количество исследуемых образцов + 1 х ПКО + 1 х ОКО.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. Для приготовления реакционной смеси необходимо:

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

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+3) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
3. В приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.
6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО,

- прошедший этап выделения НК.
7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; (производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 4.

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

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
	95	00:15		

4	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	45
---	----	-------	---	----

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

3. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.
4. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 5). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

Таблица 5 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора Rotor Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Контрольный образец	Значения C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах КОЧ-1

Принцип интерпретации результатов отражен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов для КОЧ-1

Внесенный материал	Показатель по оптическим каналам			
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
КОЧ-1	$C_t \leq 35$	Любое значение или отсутствие	–	–

Результат прохождения ПЦР-реакции, соответствующий норме: в пробирках с КОЧ-1 по каналу FAM Ct≤35, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОЧ-1

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности реагента.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

КОЧ-1, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

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

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН

2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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

Потребительская упаковка набора реагентов КОЧ-1 подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

101 листы
Должность: ген. директор
Гороповский А.П.





УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«15» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Стандартный образец предприятия Контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ-2)

Только для проведения испытаний

*Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов
гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»*

Содержание

1. Назначение	4
2. Принцип метода.....	5
3. Состав КОЧ-2.....	6
4. Технические и функциональные характеристики	6
6. Меры предосторожности при работе.....	7
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	9
8. Процедура подготовки КОЧ-2 для исследования.....	10
9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-2.....	10
10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест».....	10
11. Регистрация и интерпретация результатов	14
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОЧ-2	16
13. Утилизация	16

1. Назначение

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-2 предназначен для использования в качестве контрольного образца при проведении контроля качества «Набора реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»» в соответствии ТУ 21.20.23-026-97638376-2020, а также для оценки аналитической чувствительности, прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости набора реагентов «CoV-Influ-тест» при проведении валидации функциональных характеристик, а также в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-2, представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pRdCV2-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

Предназначенный пользователь: инженер ТК ООО «ТестГен», в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудник отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудник испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

2. Принцип метода

Метод

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

Принцип метода

Контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ-2) проходит все этапы исследования (выделение НК, мультиплексную одностадийную реакцию обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)).

С пробами НК, выделенными из Контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ-2), с использованием набора реагентов «CoV-Influ-тест» проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

3. Состав КОЧ-2

Таблица 2 – Состав КОЧ-2

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	КОЧ-2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1000 мкл

4. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики КОЧ-2.

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
КОЧ-2	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Функциональные характеристики	
1. Концентрация	Смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pRdCV2-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА)
2. Прохождение ПЦР-реакции	В пробирках с КОЧ-2 по каналу FAM Ct ≤ 35, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.

Примечание: Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

Метрологическую прослеживаемость КОЧ-2

Прослеживаемость до стандартных образцов производилась путем параллельного тестирования образца КОЧ-2 с международным стандартом «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146 в различных концентрациях. На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации образца КОЧ-2 до Международного стандарта

«Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146 можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-2 в отношении фрагмента гена *RdRp* РНК вируса SARS-CoV-2 составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-2 составляет -0,3.

6. Меры предосторожности при работе

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-2 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-2 и деградации плазмидных ДНК.

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

Реагенты, входящие в КОЧ-2, обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в КОЧ-2, не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

Работа должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:
- удалять неиспользованные реактивы 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»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе только сотрудников ООО «ТестГен»: инженера ТК, в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудников отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудников испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест», с соблюдением мер предосторожности;

- не использовать КОЧ-2 по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

В составе КОЧ-2 отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с КОЧ-2 и набором реагентов для мультиплексной ПЦР «CoV-Influ-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК (см. п. 9).

8. Процедура подготовки КОЧ-2 для исследования

КОЧ-2 готов к применению и представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pRdCV2-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 mM Трис, 0,1 mM ЭДТА).

Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-2 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-2 и деградации плазмидных ДНК.

9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-2

Выделение пробы НК проводят из 100 мкл исследуемого образца СОП с использованием следующего комплекта для экстракции:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.).

10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»

Подготовка компонентов набора «CoV-Influ-тест» для ПЦР

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.
2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: 1 x количество исследуемых образцов + 1 x ПКО + 1 x ОКО.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер 5x – 5 мкл,
2. Смесь олигонуклеотидов – 5 мкл,
3. Образец (исследуемый образец РНК, ПКО, ОКО) – 15 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+3) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
3. В приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.
6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО.

прошедший этап выделения НК.

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

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 4.

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

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
	95	00:15		

4	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	45
---	----	-------	---	----

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

3. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.
4. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 5). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

Таблица 5 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов <i>N</i> и <i>RdRp</i>)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена <i>М1</i>)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена <i>NP</i>)

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора Rotor-Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Контрольные образцы	Значения C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах КОЧ-2

Принцип интерпретации результатов отражен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов для СОП

Внесенный материал	Показатель по оптическим каналам			
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
КОЧ-2	$C_t \leq 35$	Любое значение или отсутствие	—	—

Результат прохождения ПЦР-реакции, соответствующий норме: в пробирках с КОЧ-2 по каналу FAM $Ct \leq 35$, а по каналу HEV Ct имеет любое значение или отсутствует.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОЧ-2

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности реагента.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

КОЧ-2, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

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

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам).

Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме желтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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

Потребительская упаковка набора реагентов КОЧ-2 подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

10 (десять)

Должность: ген. директор
Тороповский А.П.





УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«15» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Стандартный образец предприятия
Контрольный образец для определения
чувствительности (КОЧ-3)**

Только для проведения испытаний

*Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов
группа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»*

Содержание

1. Назначение	4
2. Принцип метода.....	5
3. Состав КОЧ-3.....	6
4. Технические и функциональные характеристики	6
6. Меры предосторожности при работе.....	8
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	9
8. Процедура подготовки КОЧ-3 для исследования.....	10
9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-3	11
10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест».....	11
11. Регистрация и интерпретация результатов	15
13. Утилизация	17

1. Назначение

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-3 предназначен для использования в качестве контрольного образца при проведении контроля качества «Набора реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»» в соответствии ТУ 21.20.23-026-97638376-2020, а также для оценки аналитической чувствительности, прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости набора реагентов «CoV-Influ-тест» при проведении валидации функциональных характеристик, а также в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-3, представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК вируса гриппа А (плазида pIAV-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 mM Трис, 0,1 mM ЭДТА).

Предназначенный пользователь: инженер ТК ООО «ТестГен», в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудник отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудник испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

2. Принцип метода

Метод

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

Принцип метода

Контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ-3) проходит все этапы исследования (выделение НК, мультиплексную одностадийную реакцию обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)).

С пробами НК, выделенными из Контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ-3), с использованием набора реагентов «CoV-Influ-тест» проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

3. Состав КОЧ-3

Таблица 2 – Состав КОЧ-3

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	КОЧ-3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1000 мкл

4. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики КОЧ-3.

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
КОЧ-3	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Функциональные характеристики	
1. Концентрация	Смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК вируса гриппа А (плазида рIAV-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида рMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).
2. Прохождение ПЦР-реакции	В пробирках с КОЧ-3 по каналу ROX Ct ≤ 35, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.

Примечание: Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

Метрологическую прослеживаемость КОЧ-3

Прослеживаемость до стандартных образцов производилась путем параллельного тестирования стандартного образца предприятия КОЧ-3 с международными стандартами в различных концентрациях. На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации образца КОЧ-3 до:

- стандарта «РНК вируса гриппа А H1N1 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации

нуклеиновых кислот: **AMPLIRUN® NOVEL INFLUENZA A H1N1 RNA CONTROL**», серия 20MBC082002-С, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-3 в отношении РНК вируса гриппа А H1N1 составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-3 составляет -0,25.

- стандарта «РНК вируса гриппа А H1 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: **AMPLIRUN® INFLUENZA A H1 RNA CONTROL**», серия 20MBC028002-С, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-3 в отношении РНК вируса гриппа А H1 составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-3 составляет -0,1.

- стандарта «РНК вируса гриппа А H3 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: **AMPLIRUN® INFLUENZA A H3 RNA CONTROL**», серия 20MBC029002-С, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-3 в отношении РНК вируса гриппа А H3 составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-3 составляет 0,15.

- стандарта «РНК вируса гриппа А H5 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: **AMPLIRUN® INFLUENZA A H5 RNA CONTROL**», серия 20MBC052002-С, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-3 в отношении РНК вируса гриппа А H5 составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-3 составляет 0,1.

6. Меры предосторожности при работе

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-3 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-3 и деградации плазмидных ДНК.

Все составные части и реагенты, входящие в состав КОЧ-3, относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в КОЧ-3, обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в КОЧ-3, не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

Работа должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы 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»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе только сотрудников ООО «ТестГен»: инженера ТК, в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудников отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудников испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест», с соблюдением мер предосторожности;

- не использовать КОЧ-3 по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

В составе КОЧ-3 отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с КОЧ-3 и набором реагентов для мультиплексной ПЦР «CoV-Influ-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК (см. п. 9).

8. Процедура подготовки КОЧ-3 для исследования

КОЧ-3 готов к применению и представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК вируса гриппа А (плазида рIAV-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и

фрагмента генома бактериофага (плазида рMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 mM Трис, 0,1 mM ЭДТА).

Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-3 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-3 и деградации плазмидных ДНК.

9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-3

Выделение пробы НК проводят из 100 мкл исследуемого образца СОП с использованием следующего комплекта для экстракции:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.).

10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»

Подготовка компонентов набора «CoV-Influ-тест» для ПЦР

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.
2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объемом

0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: 1 х количество исследуемых образцов + 1 х ПКО + 1 х ОКО.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. Для приготовления реакционной смеси необходимо:

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

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: (n+3)х5 мкл ПЦР-буфера и (n+3)х5 мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
3. В приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.
6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО, прошедший этап выделения НК.
7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора

для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 4.

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

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
	95	00:15		
4	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Rcd	45

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

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

Cy5/Red.

4. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 5). Учитываются только значения Ct, полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

Таблица 5 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов <i>N</i> и <i>RdRp</i>)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена <i>М1</i>)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена <i>NP</i>)

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора Rotor-Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Контрольные образцы	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	< 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах КОЧ-3

Принцип интерпретации результатов отражен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов для СОП

Внесенный материал	Показатель по оптическим каналам			
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5/Red
КОЧ-3	-	Любое значение или отсутствие	Ct ≤ 35	-

Результат прохождения ПЦР-реакции, соответствующий норме: в пробирках с КОЧ-3 по каналу ROX Ct ≤ 35, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОЧ-3

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности реагента.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

КОЧ-3, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

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

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН

2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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

Потребительская упаковка набора реагентов КОЧ-3 подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

10 (десять) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.П.





УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«15» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Стандартный образец предприятия
Контрольный образец для определения
чувствительности (КОЧ-4)**

Только для проведения испытаний

*Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов
гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»*

Содержание

1. Назначение	4
2. Принцип метода	5
3. Состав КОЧ-4	6
4. Технические и функциональные характеристики	6
5. Меры предосторожности при работе.....	7
6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	9
7. Процедура подготовки КОЧ-4 для исследования.....	10
8. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-4	10
9. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест».....	10
10. Регистрация и интерпретация результатов	13
12. Утилизация	16

1. Назначение

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-4 предназначен для использования в качестве контрольного образца при проведении контроля качества «Набора реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»» в соответствии ТУ 21.20.23-026-97638376-2020, а также для оценки аналитической чувствительности, прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости набора реагентов «CoV-Influ-тест» при проведении валидации функциональных характеристик, а также в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

Контрольный образец для определения чувствительности КОЧ-4, представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК вируса гриппа В (плазида rIBV-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида rMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % TE-буфере (1 mM Трис, 0.1 mM ЭДТА).

Предназначенный пользователь: инженер ТК ООО «ТестГен», в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудник отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудник испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

2. Принцип метода

Метод

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

Принцип метода

Контрольный образец для определения чувствительности (КОЧ-3) проходит все этапы исследования (выделение НК, мультиплексную одностадийную реакцию обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)).

С пробами НК, выделенными из Контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ-4), с использованием набора реагентов «CoV-Influ-тест» проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

3. Состав КОЧ-4

Таблица 2 – Состав КОЧ-4

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	КОЧ-4	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1000 мкл

4. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики КОЧ-4.

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
КОЧ-4	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Функциональные характеристики	
1. Концентрация	Смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК вируса гриппа В (плазида rIBV-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида rMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0.1 мМ ЭДТА).
2. Прохождение ПЦР-реакции	В пробирках с КОЧ-4 по каналу Cy5 $Ct \leq 35$, а по каналу HEX Ct имеет любое значение или отсутствует.

Примечание: Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

Метрологическую прослеживаемость КОЧ-4

Прослеживаемость до стандартных образцов производилась путем параллельного тестирования КОЧ-4 со стандартным образцом «РНК вируса гриппа В для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: AMPLIRUN® INFLUENZA B RNA CONTROL, серия 20MBC030002-С, в концентрации 13000 копий/мкл, производства Vircell S.L., Испания в различных концентрациях. На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации

образца КОЧ-4 до стандарта «РНК вируса гриппа В для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: AMPLIRUN® INFLUENZA B RNA CONTROL, серия 20MBC030002-С, в концентрации 13000 копий/мкл, производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация КОЧ-4 в отношении РНК вируса гриппа В составляет ~ 1000 копий/мл. Неопределенность для КОЧ-4 составляет -0.1.

5. Меры предосторожности при работе

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-4 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-4 и деградации плазмидных ДНК.

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

Реагенты, входящие в КОЧ-4, обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в КОЧ-4, не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

Работа должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы 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»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе только сотрудников ООО «ТестГен»: инженера ТК, в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудников отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудников испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест», с соблюдением мер предосторожности;

- не использовать КОЧ-4 по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

В составе КОЧ-4 отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с КОЧ-4 и набором реагентов для мультиплексной ПЦР «CoV-Influ-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК (см. п. 9).

7. Процедура подготовки КОЧ-4 для исследования

КОЧ-4 готов к применению и представляет собой смесь плазмид с синтетическими вставками фрагмента кДНК вируса гриппа В (плазида rIBV-POS с концентрацией 1 000 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида rMS2 с концентрацией 100 000 копий/мл) в 10 % ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА).

Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОЧ-4 посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОЧ-4 и деградации плазмидных ДНК.

8. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОЧ-4

Выделение пробы НК проводят из 100 мкл исследуемого образца СОП с использованием следующего комплекта для экстракции:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.).

9. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»

Подготовка компонентов набора «CoV-Influ-тест» для ПЦР

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО

и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

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

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер 5x – 5 мкл,
2. Смесь олигонуклеотидов – 5 мкл,
3. Образец (исследуемый образец РНК, ПКО, ОКО) – 15 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: (n+3)x5 мкл ПЦР-буфера и (n+3)x5 мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
3. В приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.
6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО, прошедший этап выделения НК.
7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки

в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; (производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 4.

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

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
	95	00:15		
4	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	45

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

3. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.
4. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 5). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

Таблица 5 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red

РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов <i>N</i> и <i>RdRp</i>)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена <i>M1</i>)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена <i>NP</i>)
--	-----	---	---

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора Rotor-Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Контрольные образцы	Значения C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении

для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах КОЧ-4

Принцип интерпретации результатов отражен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов для СОП

Внесенный материал	Показатель по оптическим каналам			
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
КОЧ-4	–	Любое значение или отсутствие	–	$C_t \leq 35$

Результат прохождения ПЦР-реакции, соответствующий норме: в пробирках с КОЧ-4 по каналу Cy5 $C_t \leq 35$, а по каналу HEX C_t имеет любое значение или отсутствует.

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОЧ-4

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности реагента.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

КОЧ-4, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

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

12. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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

Потребительская упаковка набора реагентов КОЧ-4 подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

10 (десять) листов

Должность: ген. директор
Тороповский А.П.





УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«15» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Стандартный образец предприятия Контрольный образец специфичности (КОС)

Только для проведения испытаний

*Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов
гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ
«CoV-Influ-тест»*

Содержание

1. Назначение	4
2. Принцип метода	5
3. Состав КОС	6
4. Технические и функциональные характеристики	6
6. Меры предосторожности при работе	6
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	8
8. Процедура подготовки КОС для исследования	9
9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОС	10
10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»	10
11. Регистрация и интерпретация результатов	12
13. Утилизация	15

1. Назначение

Контрольный образец специфичности (КОС) предназначен для использования в качестве контрольного образца при проведении контроля качества «Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»» в соответствии с ТУ 21.20.23-026-97638376-2020, а также для оценки прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости набора реагентов «CoV-Influ-тест» при проведении валидации функциональных характеристик, а также в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

Контрольный образец специфичности КОС, представляет собой раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл) с добавлением 10 мкл ВКО согласно инструкции.

Детекция флуоресцентного сигнала КОС при проведении ОТ-ПЦР-исследования набором реагентов «CoV-Influ-тест» осуществляется по каналу HEX.

Предназначенный пользователь: инженер ТК ООО «ТестГен», в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест» в соответствии с ТУ 21.20.23-026-97638376-2020; сотрудник отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудник испытательной лаборатории, в рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

2. Принцип метода

Метод

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

Принцип метода

Контрольный образец специфичности (КОС) проходит все этапы исследования (выделение НК, мультиплексную одностадийную реакцию обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)).

С пробами НК, выделенными из Контрольного образца специфичности (КОС), с использованием набора реагентов «CoV-Influ-тест» проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

3. Состав КОС

Таблица 2 – Состав КОС

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	КОС	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1000 мкл

4. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики КОС.

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
КОС	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Функциональные характеристики	
1. Концентрация	Раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл) с добавлением 10 мкл ВКО.
2. Прохождение ПЦР-реакции	Рост сигнала флуоресценции по каналу HEX, Ct ≤ 32

Примечание: Исходную концентрацию стокового раствора Jurkat (производства «Thermo Fisher Scientific», США) измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

6. Меры предосторожности при работе

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОС посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОС и деградации.

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

Реагенты, входящие в КОС, обладают низкой упругостью пар и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в КОС, не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

Работа должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы 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»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе только сотрудников ООО «ТестГен»: инженера ТК, в рамках проведения контроля качества набора реагентов «CoV-Influ-тест»; сотрудников отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в рамках проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудников испытательной лаборатории, в

рамках проведения технических испытаний с целью государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест». с соблюдением мер предосторожности:

- не использовать КОС по истечении срока годности;
- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с КОС и набором реагентов «CoV-Influ-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК (см. п. 9).

8. Процедура подготовки КОС для исследования

КОС готов к применению и представляет собой раствор геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 000 копий на 5 мкл (200 000 копий/мл) с добавлением 10 мкл ВКО.

Исходную концентрацию стокового раствора Jurkat (производства «Thermo Fisher Scientific», США) измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в КОС посторонних веществ, которые могут привести к модификации КОС и деградации.

9. Процедура выделения НК из исследуемого образца КОС

Выделение пробы НК проводят из 100 мкл исследуемого образца СОП с использованием следующего комплекта для экстракции:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»

Подготовка компонентов набора «CoV-Influ-тест» для ПЦР

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.
2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: 1 x количество исследуемых образцов + 1 x ПКО + 1 x ОКО.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. Для приготовления реакционной смеси необходимо:

1. ОТ-ПЦР-буфер 5x – 5 мкл,

2. Смесь олигонуклеотидов – 5 мкл,
 3. Образец (исследуемый образец РНК, ПКО, ОКО) – 15 мкл.
- Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:
1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
 2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+3) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
 3. В приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси
 4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
 5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.
 6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО, прошедший этап выделения НК.
 7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; (производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 6.

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (возможна

регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае $\Delta Rn > 100\,000$, что может привести к получению ложноположительных результатов! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
	95	00:15		
4	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	45

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

- 3 Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.
- 4 Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 5 По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня

флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 5). Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

Таблица 5 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
PHK SARS-CoV-2 (фрагменты генов <i>N</i> и <i>RdRp</i>)	ВКО	PHK вируса гриппа А (фрагмент гена <i>M1</i>)	PHK вируса гриппа В (фрагмент гена <i>NP</i>)

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора Rotor-Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Контрольный образец	Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах КОС

Принцип интерпретации результатов отражен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов для КОС

Внесенный материал	Показатель по оптическим каналам			
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
КОС	–	Ct ≤ 32	–	–

Результат прохождения ПЦР-реакции, соответствующий норме: в пробирках с КОС Ct по каналам FAM, ROX и Cy5 не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), а по каналу HEX Ct ≤ 32.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОС

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности реагента.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

КОС, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

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

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации

производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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

Потребительская упаковка набора реагентов КОС» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

10 (десять) листов

Должность: ген. директор

Гороповский А.Н.





УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«15» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Стандартный образец предприятия (СОП)

Только для проведения испытаний

*Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов
группа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»*

Содержание

1. Назначение	4
2. Принцип метода	5
3. Состав СОП	6
4. Технические и функциональные характеристики	6
6. Меры предосторожности при работе	8
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	10
8. Процедура подготовки СОП для исследования	12
9. Процедура выделения НК из исследуемого образца СОП	12
10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»	12
11. Регистрация и интерпретация результатов	15
13. Утилизация	17

1. Назначение

Стандартный образец предприятия (СОП) предназначен для использования в качестве контрольного образца при проведении оценки чувствительности, а также прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости набора реагентов «Набора реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2, вирусов гриппа А и В методом ОТ-ПЦР-РВ «CoV-Influ-тест»».

Контрольный образец СОП, представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемого фрагмента геномной кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pNCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл и плазида pRdCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа А (плазида pIAV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа В (плазида pIBV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 1×10^5 копий/мл) в 100 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

Предназначенный пользователь: сотрудник отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в ходе проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influ-тест», а также сотрудник испытательной лаборатории при проведении технических испытаний в рамках государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influ-тест».

2. Принцип метода

Метод

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

Принцип метода

Стандартный образец предприятия (СОП) проходит все этапы исследования: выделение НК, мультиплексную одностадийную реакцию обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)).

С пробами НК, выделенными из Стандартного образца предприятия (СОП), с использованием набора реагентов «CoV-Influ-тест» проводятся реакции одностадийной обратной транскрипции и амплификации специфических участков при помощи специфичных к ним праймеров в реакционном буфере.

Набор реагентов «CoV-Influ-тест» содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков (мишеней) геномной РНК вирусов SARS-CoV-2 и вирусов гриппа А и В, а также внутреннего контрольного образца (ВКО) (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
РНК SARS-CoV-2 (фрагменты генов N и RdRp)	ВКО	РНК вируса гриппа А (фрагмент гена M1)	РНК вируса гриппа В (фрагмент гена NP)

3. Состав СОП

Таблица 2 – Состав СОП

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	СОП	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1000 мкл

4. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Технические и функциональные характеристики СОП.

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
СОП	Прозрачная бесцветная жидкость
2. Функциональные характеристики	
1. Концентрация	Смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемого фрагмента геномной кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазида pNCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл и плазида pRdCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа А (плазида pIAV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа В (плазида pIBV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазида pMS2 с концентрацией 1×10^5 копий/мл) в 100 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).
2. Прохождение ПЦР-реакции	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с СОП по каналам FAM, ROX и Cy5 $C_t \leq 30$, по каналу HEX ≤ 32

Для оценки аналитической чувствительности набора реагентов «CoV-Influ-тест» готовят разведения контрольного образца СОП в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) до исследуемых концентраций. Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

Метрологическую прослеживаемость СОП

Прослеживаемость до стандартных образцов производилась путем параллельного тестирования стандартного образца предприятия СОП с международными стандартами в различных концентрациях. На основе полученных результатов процесса калибровки и стандартизации образца СОП до:

- Международного стандарта «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146 можно заключить, что приписанная концентрация СОП в отношении фрагмента гена *N* РНК вируса SARS-CoV-2 составляет $\sim 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет -0,1.

- Международного стандарта «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146 можно заключить, что приписанная концентрация СОП в отношении фрагмента гена *RdRp* РНК вируса SARS-CoV-2 составляет $\sim 1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет -0,05.

- стандарта «РНК вируса гриппа А H1N1 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: AMPLIRUN® NOVEL INFLUENZA A H1N1 RNA CONTROL», серия 20MBC082002-C, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация СОП в отношении РНК вируса гриппа А H1N1 составляет $\sim 1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет -0,1.

- стандарта «РНК вируса гриппа А H1 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: AMPLIRUN® INFLUENZA A H1 RNA CONTROL, серия 20MBC028002-C, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация СОП в отношении РНК вируса гриппа А H1 составляет $\sim 1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет 0,25.

- стандарта «РНК вируса гриппа А H3 для контроля методов диагностики in vitro, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: AMPLIRUN® INFLUENZA A H3 RNA CONTROL, серия 20MBC029002-C, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная

концентрация СОП в отношении РНК вируса гриппа А Н3 составляет $\sim 1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет 0,15.

- стандарта «РНК вируса гриппа А Н5 для контроля методов диагностики *in vitro*, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: **AMPLIRUN® INFLUENZA A H5 RNA CONTROL**, серия 20MBC052002-С, в концентрации 13000 копий/мкл; производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация РНК вируса гриппа А Н5 составляет $\sim 1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет 0,1.

- стандарта «РНК вируса гриппа В для контроля методов диагностики *in vitro*, основанных на амплификации нуклеиновых кислот: **AMPLIRUN® INFLUENZA B RNA CONTROL**, серия 20MBC030002-С, в концентрации 13000 копий/мкл, производства Vircell S.L., Испания можно заключить, что приписанная концентрация СОП в отношении РНК вируса гриппа В составляет $\sim 1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределенность для СОП составляет -0,05.

6. Меры предосторожности при работе

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в СОП посторонних веществ, которые могут привести к модификации СОП и деградации плазмидных ДНК.

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

Реагенты, входящие в СОП, обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в СОП, не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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

Работа должна проводиться с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы 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»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе только сотрудников отдела научно-технического развития ООО «ТестГен», в ходе проведения валидации функциональных характеристик набора реагентов «CoV-Influtest», а также сотрудников испытательной лаборатории при проведении технических испытаний в рамках государственной регистрации набора реагентов «CoV-Influtest», с соблюдением меры предосторожности и инструкций по охране труда ООО «ТестГен»;

- не использовать СОП по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий,

электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

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

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с СОП и набором реагентов «CoV-Influ-тест» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема;
4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше -16 °C;
5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, Ахуген, США);
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объемом 0,1 или 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, Ахуген, США), совместимые с используемым амплификатором;
4. Халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,1 или 0,2 мл;
7. Набор для выделения РНК (см. п. 9).

8. Процедура подготовки СОП для исследования

СОП готов к применению и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемого фрагмента геномной кДНК коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (плазмида pNCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл и плазмида pRdCV2-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа А (плазмида pIAV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл), вируса гриппа В (плазмида pIBV-POS с концентрацией 1×10^5 копий/мл) и фрагмента генома бактериофага (плазмида pMS2 с концентрацией 1×10^5 копий/мл) в 100 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

Для оценки аналитической чувствительности набора реагентов «CoV-Influ-тест» готовят разведения контрольного образца СОП в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА) до исследуемых концентраций. Исходную концентрацию плазмид измеряют с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 190-840 нм.

ВНИМАНИЕ! Запрещено внесение в СОП посторонних веществ, которые могут привести к модификации СОП и деградации плазмидных РНК.

9. Процедура выделения НК из исследуемого образца СОП

Выделение пробы НК проводят из 100 мкл исследуемого образца СОП с использованием следующего комплекта для экстракции:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.);

10. Проведение ПЦР набором реагентов «CoV-Influ-тест»

Подготовка компонентов набора «CoV-Influ-тест» для ПЦР

Перед приготовлением реакционных смесей необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих

средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК, ОТ-ПЦР-буфером, смесью олигонуклеотидов, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.
2. Отобрать необходимое количество пробирок (с оптически прозрачными крышками или стенками – в зависимости от используемого типа детектирующего амплификатора) объёмом 0,1 или 0,2 мл для ПЦР из следующего расчёта: 1 х количество исследуемых образцов + 1 х ПКО + 1 х ОКО.

А) Подготовка ОТ-ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объём реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. Для приготовления реакционной смеси необходимо:

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

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1 или 0,2 мл для ПЦР.
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эппендорф» объёмом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 5$ мкл ПЦР-буфера и $(n+3) \times 5$ мкл смеси олигонуклеотидов, где n – количество исследуемых образцов. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на вортексе.
3. В приготовленные пробирки для ПЦР внести по 10 мкл реакционной смеси
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной РНК. В пробирки для ПКО и ОКО препарат РНК не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.

- Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО прошедший этап выделения НК.
- Для сброса каплеь со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

- Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.
- Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 4.

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

Таблица 4 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	40:00		
2	95	02:00		
3	95	00:15		5
	64	00:20		
	95	00:15		

4	64	00:30	FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	45
---	----	-------	---	----

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

- Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red.
- Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct каналов FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (табл. 5). Учитываются только значения Ct, полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 4 – см. табл. 4).

Таблица 5 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red

Канал, соответствующий флуорофору			
FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red

PHK SARS-CoV-2 (фрагменты генов <i>N</i> и <i>RdRp</i>)	ВКО	PHK вируса гриппа А (фрагмент гена <i>M1</i>)	PHK вируса гриппа В (фрагмент гена <i>NP</i>)
---	-----	---	---

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора Rotor-Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе

«Устранение выбросов» (Outlier Removal) для всех каналов детекции, кроме Cy5, для которого необходимо установить значение 15% в разделе «Устранение выбросов».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Контрольный образец	Значения C_t по каналам детекции, соответствующим флуорофорам			
	FAM / Green	HEX / Yellow	ROX / Orange	Cy5 / Red
ОКО	> 35 или отсутствует	≤ 32	> 35 или отсутствует	> 35 или отсутствует
ПКО	≤ 30	≤ 32	≤ 30	≤ 30

При получении для ОКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6 результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 6, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для ПКО

значений, отличающихся от указанных в таблице 6, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах СОП

Принцип интерпретации результатов отражен в таблице 7.

Таблица 7 – Принцип интерпретации результатов для СОП

Внесенный материал	Показатель по оптическим каналам			
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
СОП	$C_t \leq 30$	$C_t \leq 32$	$C_t \leq 30$	$C_t \leq 30$

Результат прохождения ПЦР-реакции, соответствующий норме: Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с СОП по каналам FAM, ROX и Cy5 $C_t \leq 30$, по каналу HEX ≤ 32 .

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации КОС

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности реагента.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

СОП, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

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

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и

сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме желтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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

Потребительская упаковка набора реагентов СОП подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

10 (*десять*) листов

Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.

