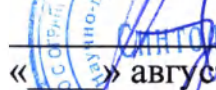


«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ООО «НПО Синтол»

«» А. Кузубов
«» августа 2023 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

НАЧАЛЬНИК ФГБУ «48 ЦНИИ»
МИНОБОРОНЫ РОССИИ

«» С. Борисевич
«» августа 2023 Г.

Медицинское изделие для диагностики ин витро

**Набор реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом обратной
транскрипции - петлевой изотермической амплификации в реальном
времени «КовиГен-LAMP-01»**

ИНСТРУКЦИЯ по применению

2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus</i> новый коронавирус, выявленный во второй половине 2019, вызвавший пандемию пневмонии нового типа
COVID-19	CO rona VI rus D isease 2019 тяжелая острая респираторная инфекция, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2
LAMP	L oop-mediated i sothermal AMPlification петлевая изотермическая реакция
RT-PCR-LAMP	- R everse T ranscription- P olimerase C hain R eaction- L oop-mediated isothermal AMPlification обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной цепной реакцией и петлевой изотермической амплификацией
ОТ-ПЦР-РВ	- обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной цепной реакцией в реальном времени
МАНК	- методы амплификации нуклеиновых кислот
НК	- нуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
БСА	- бычий сывороточный альбумин
ГСО	- государственный стандартный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
БЭБ	- буфер для экстрагирования биологического образца
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОКО-В	- отрицательный контрольный образец выделения
ВПК	- внутренний положительный контроль
ГЭ	- геном эквивалент
ТКО	- твердые коммунальные отходы
ПО	- программное обеспечение

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название набора

Набор реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции - петлевой изотермической амплификации в реальном времени «КовиГен-LAMP-01».

1.2 Назначение набора

Набор реагентов «КовиГен-LAMP-01» предназначен для качественного определения (лабораторная диагностика, скрининг, мониторинг) РНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки/ротоглотки лиц, подозрительных на заболевание новой коронавирусной инфекцией COVID-19, методом обратной транскрипции, совмещенной с петлевой изотермической амплификацией, с учетом результатов в режиме реального времени. Забор материала осуществляется в пробирку с буфером для экстрагирования биологического образца (БЭБ) с помощью стерильных тампонов-зондов, зарегистрированных в установленном порядке. Буфер БЭБ обеспечивает инактивацию вируса SARS-CoV-2 в течение 1 минуты, дополнительных этапов подготовки пробы и выделения нуклеиновых кислот не требуется.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика. Набор предназначен для использования в клинико-диагностических (стационарных и мобильных) лабораториях, в учреждениях медицины и здравоохранения.

1.4 Показания и противопоказания к применению медицинского изделия

Выявление РНК SARS-CoV-2 проводится пациентам с клинической симптоматикой респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам (см. Временные методические рекомендации

Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), утв. Минздравом России).

Абсолютные противопоказания к применению набора отсутствуют. Относительные противопоказания касаются процедуры взятия мазка и включают недавнюю травму или анатомические дефекты лицевой части черепа, другие состояния, препятствующие введению зонда или увеличивающие риск локальных травм и кровотечений. К числу возможных осложнений, которые являются следствием локального повреждения тканей, относятся местные кровотечения, болезненность или дискомфорт. Процедура взятия мазка может спровоцировать кашель, чихание и рвоту. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов, может использоваться при обследовании людей любого возраста, больных или подозрительных на заболевание коронавирусной инфекцией. Применять набор реагентов следует строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях:

- нарушения внутренней упаковки;
- отсутствия соответствия между описанием и внешним видом реагентов;
- несоблюдения условий транспортирования и хранения согласно инструкции;
- истечения срока годности.

1.5 Потенциальные потребители медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускается только квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы

амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «КовиГен-LAMP-01» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 6 компонентов, инструкции по применению и паспорта качества.

Набор реагентов рассчитан на 96 анализируемых проб (96 реакций), включая контрольные образцы.

№	Наименование	Объем	Количество
1	Реакционная смесь, РС	-	12 стрипов по 8 микропробирок
2	Разбавитель, РБ	2,6 мл	2 пробирки
3	Разбавитель, РБ-В	2,2 мл	1 пробирка
4	Положительный контрольный образец, ПКО	-	2 пробирки
5	Отрицательный контрольный образец, ОКО	1 мл	1 пробирка
6	Буфер для экстрагирования биологического образца, БЭБ	0,3 мл	96 пробирок
7	Инструкция по применению	-	1 штука
8	Паспорт качества	-	1 штука

2.2 Метод исследования

Обнаружение фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 основано на использовании метода одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией и петлевой изотермической амплификацией в (RT-PCR-LAMP) в одной микропробирке, с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

При амплификации с помощью RT-PCR-LAMP используют шесть олигонуклеотидных праймеров, специфичных фрагменту гена N,

кодирующего нуклеокапсидный белок коронавируса SARS-CoV-2 (два внешних, два внутренних и два петлевых), включая два праймера, меченных флуоресцентным красителем ROX, шесть олигонуклеотидных праймеров, специфичных фрагменту внутреннего положительного контроля (искусственная контрольная РНК KIA), включая два праймера, меченных флуоресцентным красителем Cy5, а также смесь ферментов ревертазы и SD полимеразы. Вначале осуществляется обратная транскрипция с последующими несколькими циклами ПЦР, а затем изотермическая петлевая амплификация (LAMP). Процесс амплификации методом LAMP условно разделяется на три этапа: 1) образование базовой гантелеобразной структуры, 2) этап циклической амплификации, 3) этап элонгации и повторения циклов. В результате такой реакции образуется множество конкатемеров инвертированных повторов целевого фрагмента, формирующих в пространстве разветвленные структуры. Визуализация результатов амплификации осуществляется путем флуоресцентной детекции в режиме реального времени. Постановка RT-PCR-LAMP осуществляется на оборудовании, обеспечивающем необходимые температурно-временные параметры и возможность детекции флуоресцентного сигнала (п. 5.1 настоящей инструкции).

Данный набор реагентов реализует преимущества мультиплексной одностадийной реакции ОТ-ПЦР-РВ, совмещенной с петлевой изотермической амплификацией. В одной микропробирке одновременно проводятся две конкурентные реакции. Первая реакция позволяет обнаружить специфические фрагменты РНК коронавируса SARS-CoV-2, а вторая реакция позволяет исключить недостоверные результаты при получении отрицательного результата по первой реакции. Сигналы флуоресценции регистрируются независимо друг от друга по следующим каналам: ROX – коронавирус SARS-CoV-2; Cy5 – внутренний положительный контроль.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит РНК SARS-CoV-2. Отрицательный результат теста означает, что

исследуемый материал не содержит РНК SARS-CoV-2.

2.3 Ограничения метода

В инфицированном материале РНК SARS-CoV-2 может быть не обнаружена по причине её отсутствия в анализируемой пробе или ингибирования реакции амплификации (ложноотрицательный результат). Ложноотрицательный результат анализа выявляется с помощью контроля по каналу Cy5 и контрольного образца **ПКО** (п. 7.3 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация **РБ**, **РБ-В** и/или **РС** на этапе подготовки к проведению амплификации. Для выявления контаминации применяются отрицательные контрольные образцы амплификации (**ОКО**) (п. 7.3 настоящей инструкции).

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

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

Тест не определяет наличие SARS-CoV-2, если его концентрация ниже заявленной аналитической чувствительности.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Аналитические характеристики набора реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции - петлевой изотермической амплификации в реальном времени «КовиГен-LAMP-01» – специфичность, чувствительность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) – установлены в ходе валидации набора реагентов.

В ходе проведения клинико-лабораторных испытаний на лабораторной базе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России (123098, г. Москва, ул.

Гамалеи, д. 18) были подтверждены заявленные функциональные характеристики медицинского изделия.

3.1.1 Чувствительность

Аналитическая чувствительность – не более $1,0 \times 10^3$ копий РНК в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹) с воспроизводимостью не менее 95 %.

3.1.2 Специфичность

Аналитическая специфичность анализа – 100%.

Оценку специфичности *in vitro* проводили на образцах НК из панели возбудителей респираторных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (таблица 2), а также на ДНК человека (*Homo sapiens*).

Таблица 2 – Панель возбудителей респираторных инфекций «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

№ п/п	Наименование микроорганизма	Номер или наименование штамма	Исходная концентрация
1	Вирус гриппа А	А/Москва/78/2020 pdm09 (H1N1)	64 ГАЕ/50мкл 10 ⁷ ТЦИД ₅₀ /мл 5,34*10 ⁷ БОЕ/мл (не менее 1*10 ⁷ БОЕ/мл) не менее 1*10 ⁷ ГЭ/мл
2	Вирус гриппа А	А/Чебоксары/125/2020pdm09 (H1N1)	32 ГАЕ/50мкл 10 ^{7,4} ТЦИД ₅₀ /мл 1*10 ⁸ БОЕ/мл (не менее 6*10 ⁷ БОЕ/мл) не менее 5*10 ⁶ ГЭ/мл
4	Вирус гриппа А	А/Москва/1/2022 (H3N2)	32 ГАЕ/50мкл 10 ^{6,25} ТЦИД ₅₀ /мл 3,2*10 ⁷ БОЕ/мл (не менее 1*10 ⁷ БОЕ/мл) не менее 1*10 ⁸ ГЭ/мл
5	Вирус гриппа А	А/grebe/Tyva/Tyv06-1/06 (H5N1)	ГАЕ/50мкл 10 ^{7,5} ТЦИД ₅₀ /мл
6	Вирус гриппа А	А/goose/Kalmykia/813/2016 (H5N8)	64 ГАЕ/50мкл 10 ^{7,75} ТЦИД ₅₀ /мл
7	Вирус гриппа В	В/Москва/7/2022 (Victoria lineage)	64 ГАЕ/50мкл 10 ^{4,5} ТЦИД ₅₀ /мл

8	Вирус гриппа В	В/Грозный/6/2019 (Yamagata lineage)	64 ГАЕ/50мкл 10 ³ ТЦИД ₅₀ /мл
9	Коронавирус SARS-CoV-2	линия В.1.1.529 (вариант «Омикрон»)	10 ⁹ ГЭ/мл
10	Коронавирус SARS-CoV-2	ГСО 11661-2020 «ГК 2020/1»	10 ⁹ копий/дм ³
11	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC®49619™	10 ⁶ КОЕ/мл
12	<i>Haemophilus influenza</i>	ATCC®49247™	10 ⁶ КОЕ/мл
13	Аденовирус 5 типа	394	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml
14	Метапневмовирус человека	HM-1	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml
15	Респираторно- синцитиальный вирус	hRSV-1	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml
16	Аденовирус 2 типа	391	5,0 lg ID ₅₀ /ml

Ложноотрицательные и ложноположительные результаты (перекрестная реактивность) при анализе образцов отсутствовали.

3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость

В ходе валидации набора реагентов в различных вариантах анализа, четырех видов амплификаторов, мест и времени анализа, а также различными операторами, была проведена оценка прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости. Повторяемость и воспроизводимость определения РНК SARS-CoV-2 были установлены путем тестирования положительных и отрицательных клинических образцов (мазки из носоглотки/ротоглотки) в пяти повторностях на четырех видах амплификаторов.

Под повторяемостью понимали степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же комплекта оборудования в пределах короткого промежутка времени. Под воспроизводимостью понимали степень близости друг к другу независимых

результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, с использованием различных комплектов оборудования.

Внутрипостановочная повторяемость результатов исследования на выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 набором реагентов во всех вариантах анализа на четырех видах амплификаторов составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторов каждого образца не более 10% (для двух постановок). Межпостановочная воспроизводимость результатов исследования образцов на выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 набором реагентов во всех вариантах анализа на четырех видах амплификаторов составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторов каждого образца не более 10%.

В результате проведенных исследований наблюдалась полная внутрипостановочная и межпостановочная воспроизводимость для всех положительных и отрицательных образцов, совпадение результатов составило 100 %.

3.1.4 Оценка влияния интерферирующих веществ

Ингибирующего влияния эндогенных (гемоглобин 200 мкг/мл, муцин 5%) и экзогенных (Хлоргексидин 0,005%, Стоматофит 10%, раствор Люголя с глицерином 0,1%, Мирамистин 0,001%) потенциально интерферирующих веществ на результат ПЦР при исследовании образцов набором «КовиГен-LAMP-01» на функциональные характеристики набора не выявлено.

3.2 Диагностические характеристики

Диагностические характеристики будут определены в ходе клинических испытаний.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора - класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

Работу проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организаций и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» и «Временных рекомендаций по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV». При работе необходимо всегда выполнять следующие требования: рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

Исследования материала на наличие SARS-CoV-2 с помощью МАНК проводят в учреждениях, имеющих разрешение на работу с возбудителями III-IV группы патогенности. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав набора»). Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшего подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%;
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- Удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке;
- Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Подготовку к реакции амплификации с использованием набора реагентов возможно проводить

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 15-30 мин;
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организаций и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, так как это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию;

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности;
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы;

Компоненты набора «Разбавитель, РБ» и «Разбавитель, РБ-В», содержат азид натрия в концентрации, безопасной для пользователя. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. Вреден при проглатывании. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

В состав компонентов набора «Разбавитель, РБ» и «Разбавитель, РБ-В» входит материал животного происхождения – бычий сывороточный альбумин (БСА), являющийся биологически безопасным.

В состав компонента набора «Реакционная смесь, РС» входят следующие материалы животного происхождения – рекомбинантная Taq-полимераза и рекомбинантная MmLV-ревертаза, являющиеся биологически безопасными.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку входящие в состав изделия вещества (азид натрия, Taq-полимераза, MmLV-ревертаза и БСА) являются биологически безопасными.

Применение изделия для диагностики ин витро «Ковиген-LAMP-01» не

создает прямого риска для пациента или обследуемого лица, так как его не используют наружно или внутренне (энтерально). При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным. Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- канцерогенный эффект отсутствует;
- мутагенное действие отсутствует;
- репродуктивная токсичность отсутствует.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ – зарегистрированный в РФ как медицинское изделие и имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, R6G, ROX, Cy5 (либо их спектральным аналогам):

- «АНК-32 (32М)» (Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции «АНК» по ТУ 9443-003-04699534-2005, ИАП РАН, г. Санкт-Петербург; ФСР 2010/08892);
- CFX-96 (Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, «Био-Рад Лабораториз, Инк.» США, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, ФСЗ 2008/03399);
- DTprime (Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6, 4X1, 5X1, 6X1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия; ФСР 2011/10229);
- QuantStudio5 (Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов

ПЦР в режиме реального времени, "Лайф Текнолоджис Холдинге Пте. Лтд.", Сингапур, Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapore; РЗН 2019/8446).

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение (ПО), поставляемое производителем прибора:

- АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемое с приборами «АНК-32М»;
- Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемое с прибором CFX-96;
- QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3 и выше, поставляемое с прибором QuantStudio 5;
- RealTime_PCR v7.9.5.48 и выше, поставляемое с прибором DT.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ООО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 0,5-10 мкл или 2-20 мкл, 10-100 мкл или на 20-200 мкл; штатив для данных дозаторов.

5.4 Другое используемое оборудование

- Микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903», ФСР 2009/05969);
- микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901», РЗН 2014/1454);
- штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 и 2 мл (кат. № СТ-17, Синтол);
- штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, Синтол);
- холодильник/морозильник на 2-8 °С/минус 16-20 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Анализируемыми пробами являются мазки из носоглотки/ротоглотки лиц, подозрительных на заболевание новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Процедура приготовления положительного контрольного образца

В пробирку с сухим **ПКО** из набора реагентов «КовиГен-LAMP-01» добавляют 30 мкл **ОКО**, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов **ПКО** допускается при температуре от минус 16 до минус 20 °С течение срока годности набора реагентов.

7.2 Забор клинического материала и подготовка пробы

Отбор проб производят с помощью тампон-зондов (тупферов), зарегистрированных в установленном порядке. Для повышения концентрации вируса носоглоточные и орофарингеальные мазки помещают в одну пробирку.

Для взятия мазка из носоглотки тампон-зонд извлекают из упаковки,

после чего вводят его последовательно в каждую ноздрю, достигая задней поверхности носоглотки. Извлечение зонда сопровождают вращательными движениями. После взятия мазка тампон-зонд помещают в пробирку с буфером для экстрагирования биологического образца **БЭБ** из состава набора реагентов, тампон-зонд обрезают, пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют.

Мазок со слизистой оболочки ротоглотки берут вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон-зонд помещают в пробирку с буфером для экстрагирования биологического образца **БЭБ** и зондом с мазком из носоглотки. Конец тампон-зонда обрезают, пробирку плотно закрывают крышкой. Образец готов для проведения анализа в соответствии с п. 7.3.1 настоящей инструкции.

Целевой анализ сохраняет свои индикаторные характеристики при температуре от 20 до 30 °С в течение 2 часов, от 2 до 8 °С – в течение 24 часов, от минус 16 до минус 20 °С – в течение 6 месяцев. После хранения при температуре от 2 до 8 °С и от минус 16 до минус 20 °С непосредственно перед проведением анализа образцы выдерживают при температуре не менее 20 °С в течение 30 минут.

Допускается использование дополнительного этапа выделения РНК из пробы с использованием зарегистрированного в Российской Федерации в установленном порядке набора «РИБО-Преп» (ФСР 2008/03147) в строгом соответствии с инструкцией производителя. Дальнейший анализ образцов выделенной РНК проводят в соответствии с п. 7.3.2 настоящей инструкции.

Оставшийся клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

7.3 Проведение амплификации

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную

маркировку «RNase-free», «DNase-free».

На всех этапах проведения анализа необходимо использовать наконечники с аэрозольным барьером!

7.3.1 Вариант для анализа нативных проб из буфера БЭБ (без дополнительного этапа выделения РНК)

Расход реагентов

На один цикл исследований расходуется:

- аналитические пробирки **РС** – по одной на каждую анализируемую пробу плюс две дополнительно для контролей **ПКО** и **ОКО**;
- **ПКО** – 4 мкл;
- **ОКО** – 4 мкл;
- **РБ** – по **46** мкл на каждую анализируемую пробу и дополнительно по **46** мкл на каждую пробирку с контролями (**ПКО** и **ОКО**).

Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводят в один этап:

- набор реагентов извлекают из холодильника, **РБ**, **ПКО**, **ОКО** перемешивают на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;
- устанавливают необходимое количество аналитических микропробирок **РС**: соответствует числу исследуемых проб плюс 1 пробирка для контроля **ПКО** и 1 пробирка для контроля **ОКО**, маркируют пробирки в соответствии с протоколом исследования;
- открывают крышки пробирок и вносят в них по **46** мкл **РБ**;
- используя наконечники с аэрозольным барьером, вносят в соответствующую микропробирку 4 мкл **ОКО**, закрывают крышку;

Примечание. После смешивания реакционной смеси и образцов микропробирки могут храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 15 мин. перед установкой в амплификатор.

- пробирки с исследуемыми образцами тщательно перемешивают на

- вортексе в течение 5-10 секунд, центрифугируют в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹, после чего, используя наконечники с аэрозольным барьером, вносят по 4 мкл раствора в соответствующие микропробирки и закрывают крышки данных микропробирок;
- используя наконечники с аэрозольным барьером, вносят в соответствующую микропробирку 4 мкл **ПКО** и закрывают крышку;
 - перемешивают содержимое микропробирок на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют 30 секунд при 3000 об·мин⁻¹ на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл;
 - помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ и прикрывают крышки микропробирок;

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации и программируют амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно таблицам 1÷4;
- вводят сведения об образцах, закрывают крышку прибора и запускают исследование в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
- по окончании выполнения программы приступают к анализу и интерпретации результатов.

7.3.2 Вариант для анализа образцов выделенной РНК

Расход реагентов

На один цикл исследований расходуется:

- аналитические пробирки **РС** – по одной на каждую анализируемую пробу плюс 2 дополнительно для контролей **ПКО** и **ОКО**;
- **ПКО** – 4 мкл;

- **ОКО** – 4 мкл;
- **РБ-В** – по 20 мкл на каждую анализируемую пробу;
- **РБ** – по 46 мкл на каждую пробирку с контролями (**ПКО** и **ОКО**).

Последовательность проведения этапов анализа

Анализ с помощью набора реагентов проводят в один этап:

- набор реагентов извлекают из холодильника, **РБ, РБ-В, ПКО, ОКО** перемешивают на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют в течение 5-10 секунд при 3000 об·мин⁻¹;
- устанавливают необходимое количество аналитических пробирок **РС**: соответствует числу исследуемых проб плюс 1 пробирка для контроля **ПКО** и 1 пробирка для контроля **ОКО**, маркируют пробирки в соответствии с протоколом исследования;
- используя наконечники с аэрозольным барьером, вносят в микропробирку для контроля **ОКО** 46 мкл **РБ (!)** и 4 мкл **ОКО**, закрывают крышку микропробирки;

Примечание. После смешивания реакционной смеси и образцов микропробирки могут храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 15 мин. перед установкой в амплификатор.

- в микропробирки для исследуемых образцов вносят по 20 мкл **РБ-В**;
- в соответствии с маркировкой вносят в микропробирки для исследуемых образцов по 30 мкл растворов выделенной РНК, закрывают крышки данных микропробирок;
- используя наконечники с аэрозольным барьером, вносят в микропробирку для контроля **ПКО** 46 мкл **РБ (!)** и 4 мкл **ПКО**, закрывают крышку микропробирки;
- перемешивают содержимое микропробирок на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируют 30 секунд при 3000 об·мин⁻¹ на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл;

— помещают микропробирки в прибор для ПЦР-РВ и прикатывают крышки микропробирок;

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

Таблица 1 - Режим амплификации для приборов АНК

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	37 °С – 180 секунд	1
2	92 °С – 15 секунд	3
3	65 °С – 20 секунд	
4	64,9 °С – 10 секунд	25
5	65 °С – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции по каналам ROX и Cy5	

Таблица 2 - Режим амплификации для приборов DT

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	37 °С – 180 секунд	1
2	91 °С – 10 секунд	3
3	64 °С – 30 секунд	
4	64 °С – 60 секунд Считывание сигнала флуоресценции по каналам ROX и Cy5	25

Таблица 3 - Режим амплификации для приборов CFX96

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	37 °С – 180 секунд	1
2	92 °С – 15 секунд	2
3	65 °С – 20 секунд	
4	65 °С – 50 секунд Считывание сигнала флуоресценции по каналам ROX и Cy5	25

Таблица 4 - Режим амплификации для приборов QS5

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	37 °С – 180 секунд	1
2	92 °С – 15 секунд	2
3	65 °С – 20 секунд	
4	65 °С – 50 секунд Считывание сигнала флуоресценции по каналам ROX и Cy5	33

- включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации и программируют амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно таблицам 1÷4;
- вводят сведения об образцах, закрывают крышку прибора, запускают исследование в соответствии с инструкцией по эксплуатации и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора;
- по окончании выполнения программы приступают к анализу и интерпретации результатов.

7.4 Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Проведение амплификации и оценку результатов проводят с помощью приборов для ПЦР-РВ (см. п.5.1 настоящей инструкции) и специализированного ПО, поставляемого производителем прибора:

- АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М»;
- Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемая с прибором CFX-96;
- QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3 и выше, поставляемая с прибором QuantStudio 5;
- RealTime_PCR v7.9.5.38 и выше, поставляемая с прибором DTlite/DTprime.

Работу с ПО осуществляют согласно руководству по эксплуатации

прибора.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) кривой флуоресценции по каналам ROX и Cy5. Кинетическая кривая роста сигнала флуоресценции означает любую величину порогового цикла C_t меньше 25 для приборов АНК и CFX, меньше 33 – для приборов QS5 и меньше 25 – для приборов DT. Отсутствие регистрации роста сигнала прибором описывается ПО прибора, например, как предельная величина порогового цикла ($C_t \geq 25$ в приборах «АНК»), либо как ее отсутствие (N/A в приборах CFX, Undetermined в приборах QuantStudio) и т.п. Подробная информация приведена в руководстве по эксплуатации конкретного прибора.

Результаты анализа **не подлежат** учету в случае:

- роста сигнала флуоресценции по каналу ROX в пробирке с **ОКО** (ложноположительный результат всего эксперимента);
- отсутствия роста сигнала флуоресценции по каналу ROX в пробирке с **ПКО** (ложноотрицательный результат всего эксперимента);
- отсутствия роста сигнала флуоресценции в пробирке с анализируемым образцом по каналам Cy5 и ROX одновременно (ингибирование реакции, ложноотрицательный результат отдельной пробы).

Результаты анализа **подлежат** учету в случае:

- отсутствия роста сигнала флуоресценции по каналу ROX в пробирке с **ОКО**;
- роста сигнала флуоресценции в пробирке по каналу ROX с **ПКО**;
- роста сигнала флуоресценции в пробирках с анализируемыми пробами по каналу ROX и/или по каналу Cy5.

Интерпретацию результатов анализа проводят согласно таблице 5.

Для корректной интерпретации результатов на приборах DT требуются следующие настройки анализа (Теста):

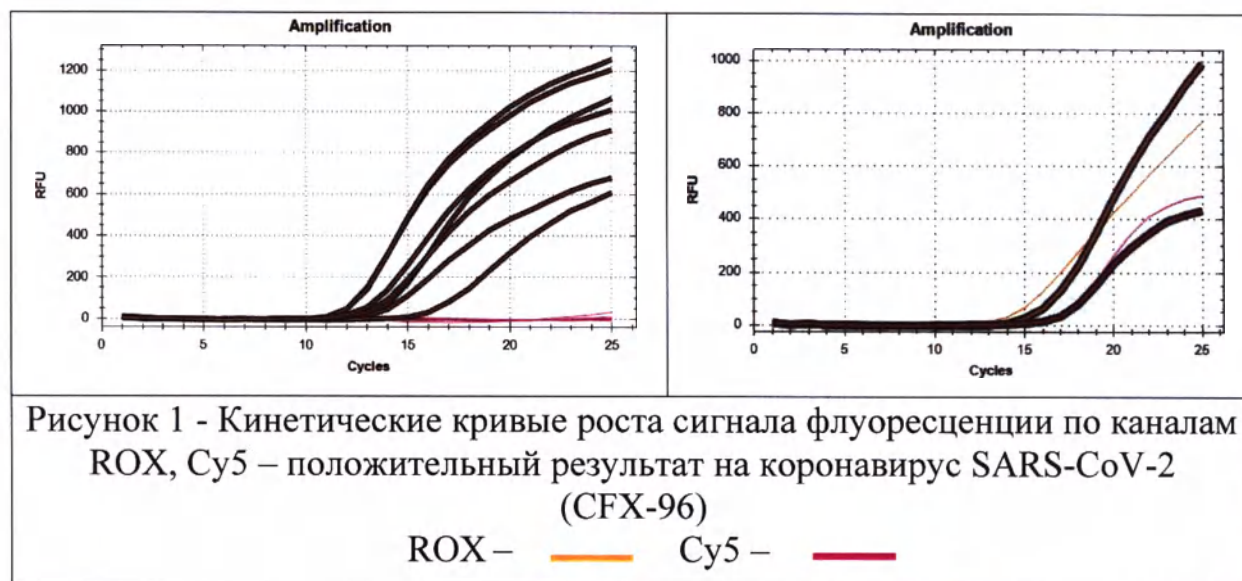
- метод «Пороговый»;
- анализ «Качественный»;
- критерий положительного результата ПЦР – 70%

— критерии достоверности результатов:

- нижняя граница/порог положительного результата – 3% F(Cp);
- верхняя граница/порог нормализации данных – 5% F(Cp).

Таблица 5 – Интерпретация результатов анализа с использованием набора реагентов «КовиГен-LAMP-01»

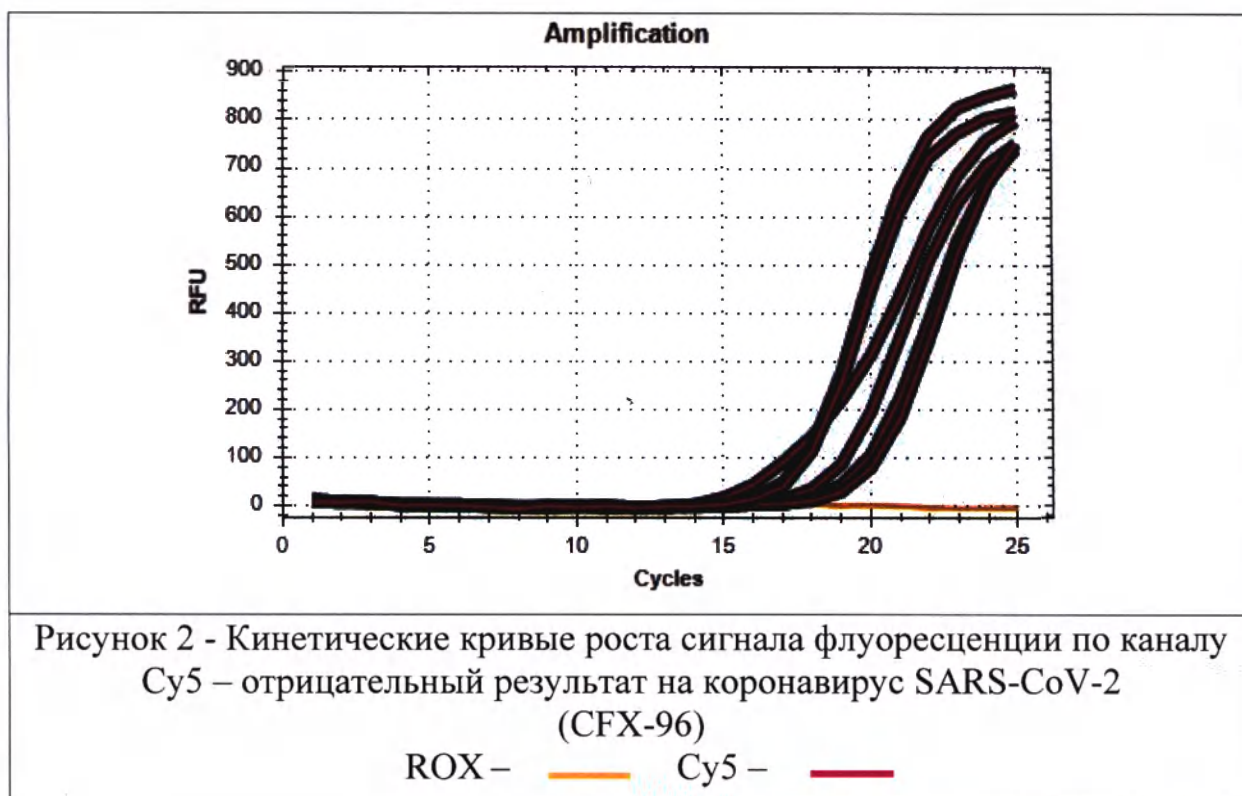
Образец	Результат по каналу...		Интерпретация результата
	ROX	Cy5	
Результаты всего эксперимента не подлежат учёту в любом из следующих случаев			
ПКО	— ¹	любой ²	Ложноотрицательный результат, ингибирование анализа
ОКО	+ ³	любой	Ложноположительный результат, контаминация реагентов
Результаты анализа не подлежат учёту для конкретной пробы			
проба	—	—	Ложноотрицательный результат, ингибирование анализа
Результаты анализа подлежат учёту при получении следующих результатов			
ПКО	+	любой	Набор реагентов работоспособен
ОКО	—	+	Контаминация отсутствует
проба	+	любой	В пробе содержится РНК SARS-CoV-2
	—	+	В пробе отсутствует РНК SARS-CoV-2



¹ «–» значение порогового цикла отсутствует

² величина порогового цикла не имеет значения

³ «+» значение порогового цикла определено



7.5 Возможные ошибки

Таблица 6. Возможные ошибки и действия при возникновении и исправлении возникающих ошибок анализа.

№	Возможная ошибка	Действие
1	Для положительного контроля ПКО значение порогового цикла Ct по каналу ROX отсутствует.	Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК. Возможная причина – ошибка при подготовке к реакции (не внесен ПКО в пробирку).
2	Для отрицательного контроля ОКО присутствует значение порогового цикла Ct по каналу ROX.	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов в ходе постановки амплификации. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.
3	Для исследуемого образца, в котором не обнаружена специфическая РНК, значение порогового цикла Ct по каналу Cy5 отсутствует.	Недостоверный (ложноотрицательный) результат, ингибирование. Необходимо повторить реакцию амплификации заингибированного исследуемого образца. Возможная причина – ошибка при подготовке к реакции (не внесен образец в пробирку).
4	Для отрицательного контроля ОКО и исследуемых образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК, значение порогового цикла Ct по каналу Cy5 отсутствует.	Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех заингибированных исследуемых образцов и ОКО. При получении аналогичного результата необходимо обратиться на предприятие-производитель.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «КовиГен-LAMP-01» хранят в холодильнике или сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Суммарный срок хранения при температуре от плюс 9 до плюс 25 °С не должен превышать 14 суток в течение срока годности набора реагентов.

8.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора «КовиГен-LAMP-01» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. Допускается транспортирование до 14 суток при температуре от плюс 9 до плюс 25 °С (без соблюдения «холодовой цепи»).

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

8.3 Срок годности набора

Набор реагентов должен применяться согласно утвержденной инструкции по применению. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Срок годности разведенных препаратов ПКО - не более месяца при температуре хранения от минус 16 до минус 20 °С.

Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

8.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с амплификатами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, а также являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, зарегистрированных в Российской Федерации, а также изделия, обнаруженные и конфискованные таможенными органами Российской Федерации при их ввозе на территорию Российской Федерации, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО (СанПиН 2.1.3684-21).

Компоненты набора «Разбавитель, РБ», «Разбавитель, РБ-В», содержащие азид натрия, утилизируются путем смыва их в водопроводно-канализационную систему с предварительным разведением водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный и бытовой мусор.

8.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «КовиГен-LAMP-01» направлять на предприятие-изготовитель.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов,

рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель и в уполномоченную государственную регулируемую организацию в соответствии с действующим законодательством.

9. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА И В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Использовать до
	Код партии (серия)
	Дата производства
	Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

Прошито, пронумеровано,
проброшюровано 30 листов

Начальник ФГБУ «48 ЦНИИТ»
Минобороны России

С.Борисевич

