

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации
(ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ)

Экз. № 2

УТВЕРЖДАЮ

Врио начальника

ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ



И.А. Куркин

2023 г.

**Набор реагентов
для качественного выявления вируса SARS-CoV-2
методом изотермической полимеразной цепной реакции в мазках
из ротоглотки «SARS-CoV-2-изотест»**

по ТУ 21.20.23-002-07669108-2022

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Санкт-Петербург
2023 г.

Настоящая инструкция распространяется на медицинское изделие:

Набор реагентов для качественного выявления вируса SARS-CoV-2 методом изотермической полимеразной цепной реакции в мазках из ротоглотки «SARS-CoV-2-изотест» по ТУ 21.20.23-002-07669108-2022.

Состав:

Часть 1

1. Лизирующий буферный раствор, 4,4 мл – 1 фл.
2. Пробирки Safe-Lock с защелкой объемом от 0,5 мл до 2,0 мл (Safe-Lock tubes 0,5-2,0 ml) (ПУ №ФСЗ 2009/04520), 1,5 мл – 18 шт.
3. Тампон-зонд МиниМед стерильный ТУ 32.50.50-034-29508133-2020: зонд пластиковый (полипропилен), тампон хлопковый, длина: 150 мм (ПУ № РЗН 2021/15079) – 18 шт.
4. Вкладыш – 1 шт.

Часть 2

1. Смесь ферментов, 0,33 мл – 1 пр.
2. Реакционная смесь, 0,792 мл – 1 пр.
3. Реакционный буферный раствор, 0,165 мл – 1 пр.
4. Краситель, 0,0074 г – 1 пр.
5. Вода деионизированная, 1,0 мл – 2 пр.
6. Положительный контрольный образец «ПКО», 0,3 мл – 1 пр.
7. Отрицательный контрольный образец «ОКО», 0,3 мл – 1 пр.
8. Масло минеральное, 1,3 мл – 1 пр.

Комплект поставки:

1. Набор реагентов для качественного выявления вируса SARS-CoV-2 методом изотермической полимеразной цепной реакции в мазках из ротоглотки «SARS-CoV-2-изотест» по ТУ 21.20.23-002-07669108-2022.
2. Инструкция по применению – 1 шт.
3. Паспорт – 1 шт. (предоставляется в составе поставки на каждую серию изделия).

Сокращенное наименование: «SARS-CoV-2-изотест».

Назначение

Предназначен для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале (мазки из ротоглотки) методом изотермической полимеразной цепной реакции с визуальной детекцией результатов реакции.

Предназначен как вспомогательное средство при профессиональном применении в диагностике *in vitro* инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у людей с клинической симптоматикой респираторных заболеваний для всех групп населения.

Функциональное назначение

Набор реагентов «SARS-CoV-2-изотест» предназначен как вспомогательное средство при профессиональном применении в диагностике *in vitro* инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у людей с клинической симптоматикой респираторных заболеваний для всех групп населения.

Тип анализируемого образца: мазки из ротоглотки.

Целевой анализ: РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Исследуемый материал: материалом для исследования являются препараты нуклеиновых кислот, выделенные из образцов биологического материала (мазки из ротоглотки) с помощью набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест».

Потенциальный пользователь

Только для профессионального использования (профессиональная квалификационная группа «Средний медицинский и фармацевтический персонал не ниже 2 квалификационного уровня и профессиональная квалификационная группа «Врачи и провизоры» всех уровней (Приказ № 526 от 06.08.2007 г. «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).

ВНИМАНИЕ! К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

«SARS-CoV-2-изотест» может использоваться при исследовании биологического материала, взятого у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания с подозрением на инфекцию COVID-19, а также у лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний и не являющихся контактными с больными COVID-19 вне зависимости от возраста и пола.

Показания к применению

Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом изотермической полимеразной цепной реакции 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, контактными лицам или с целью скрининга населения с целью ранней диагностики (см. Временные методические рекомендации профилактика, диагностика

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

Противопоказания к применению

Противопоказано использование набора реагентов с истекшим сроком годности.

Противопоказано использование набора реагентов при несоблюдении условий хранения, транспортирования и инструкции по применению.

Побочные эффекты

При строгом соблюдении инструкции по применению побочные эффекты не выявлены.

Область применения: клиническая лабораторная диагностика.

Кратность применения

Изделие однократного применения.

Перечень материалов животного и (или) человеческого происхождения, лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

В составе изделия отсутствуют материалы человеческого происхождения, лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Методы стерилизации и дезинфекции изделия

Изделие нестерильное, не требует стерилизации и дезинфекции.

Описание целевого анализа и сведения о его научной обоснованности

Набор «SARS-CoV-2-изотест» позволяет выявить в ходе реакции амплификации специфические консервативные участки генов ORF1ab и N вируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19.

COVID-19 – это острое респираторное инфекционное заболевание с высоким фактором риска среди большинства людей. В настоящее время основным источником инфекции являются пациенты, инфицированные новым коронавирусом (SARS-CoV-2); бессимптомно инфицированные люди также могут быть источником инфекции. По данным текущего эпидемиологического исследования, инкубационный период составляет от 1 до 14 дней, в основном от 3 до 7 дней.

Коронавирусы – это обширное семейство вирусов, вызывающих заболевания, варьирующиеся от простуды до более тяжелых заболеваний, например, тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV).

Клиническими проявлениями являются системные симптомы, такие как лихорадка и усталость, сопровождающиеся сухим кашлем, одышкой и т.д., которые могут быстро развиваться в тяжелую пневмонию, расстройство дыхания и острую дыхательную недостаточность. Дистресс-синдром, септический шок, полиорганная недостаточность, тяжелые нарушения

кислотно-щелочного обмена и другие симптомы еще более опасны для жизни.

Принцип метода

Выделение и выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 набором реагентов «SARS-CoV-2-изотест», основанное на методе изотермической полимеразной цепной реакции, включает в себя два этапа работы: экстракция РНК из образцов биологического материала, постановка одношаговой амплификации участка кДНК вируса с этапом обратной транскрипции и визуальную оценку результатов анализа. Реакция обратной транскрипции проводится с целью образования комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК.

В качестве матрицы для одноступенчатой амплификации с этапом обратной транскрипции используется РНК, выделенная с помощью буферного раствора, обеспечивающего лизис и высвобождение нуклеиновых кислот. Одноступенчатый способ выделения РНК позволяет минимизировать потери генетического материала и сократить время экстракции и проведения реакции.

Экстракция РНК представляет собой преаналитический этап в клинической лабораторной диагностике.

Для проведения реакции обратной транскрипции и амплификации за одну стадию и при одной температуре используются два фермента: термоустойчивая обратная транскриптаза и Bst – ДНК полимераз (UltraFast Bst ДНК-полимераза), обладающая цепь-вытесняющей активностью. Таким образом, увеличивается эффективность реакции и снижается риск контаминации исследуемого образца. Реакция проводится при постоянной температуре и позволяет осуществить процесс наработки целевого продукта в термостате, а не в амплификаторе.

В ходе реакции происходит амплификация специфических участков ORF1ab и N генов вируса SARS-CoV-2.

Прямая визуальная детекция результатов реакции осуществляется благодаря использованию красителя гидроксинафтола синего, который окрашивает раствор в фиолетовый цвет в присутствии ионов магния. В процессе реакции амплификации образуется большое количество нерастворимого пирофосфата магния, которое приводит к уменьшению концентрации ионов магния в растворе и изменению цвета от фиолетового до голубого. При наличии в пробе целевой РНК и амплификации генов ORF1ab и N коронавируса SARS-CoV-2 реакционная смесь окрашивается в голубой цвет. При отсутствии целевых продуктов реакции реакционная смесь остается фиолетового цвета.

Положительный контрольный образец «ПКО» необходим для проверки того, что ненадлежащее состояние реактивов в составе набора реагентов, техническое состояние прибора, выбранный режим амплификации

или пробоподготовка не привели к отсутствию или подавлению амплификации даже при наличии целевых молекул РНК в образце.

Отрицательный контрольный образец «ОКО» необходим для проверки того, что амплификация не является следствием случайного нежелательного попадания РНК из окружающего воздуха или поверхностей в пробирку или из одной пробирки в другую (контаминации).

Положительный контрольный образец был получен путем клонирования синтезированных ДНК-фрагментов, несущих вирусоспецифическую вставку, в плазмиду pUC57. Концентрация плазмидной ДНК составляет 3×10^{10} копий ГЭ/мл. Постановка амплификации осуществляется в твердотельном термостате, зарегистрированном как медицинское изделие в РФ, например, «TDB-120» (ООО «BioSan», Латвия).

Специфическая патология

Коронавирусное заболевание COVID-19, вызванное вирусом SARS-CoV-2.

Характеристика набора реагентов

Набор реагентов «SARS-CoV-2-изотест» не требует технического обслуживания и калибровки. Набор реагентов включает комплект реагентов для экстракции РНК из образцов биологического материала и проведения изотермической амплификации с этапом обратной транскрипции.

Технические характеристики

Для проведения анализа необходимо использовать реагенты из одной упаковки набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест» по 21.20.23-002-07669108-2022. Использование компонентов из разных упаковок набора реагентов запрещается.

Характеристики компонентов набора реагентов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Характеристики компонентов набора реагентов, часть 1

№ п/п	Название компонентов набора	Описание	Объем/Длина	Количество в упаковке
1.	Лизирующий буферный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	4,400 ± 0,044 мл	1 фл.
2.	Пробирки Safe-Lock с защелкой объемом от 0,5 мл до 2,0 мл (Safe-Lock tubes 0,5-2,0 ml) (ПУ № ФСЗ 2009/04520), 1,5 мл ¹	Пробирки Safe-Lock с защелкой объемом от 0,5 мл до 2,0 мл (Safe-Lock tubes 0,5-2,0 ml) (ПУ №ФСЗ 2009/04520), 1,5 мл	1,5 мл	18 шт.

№ п/п	Название компонентов набора	Описание	Объем/Длина	Количество в упаковке
3.	Тампон-зонд МиниМед стерильный ТУ 32.50.50-034-29508133-2020: зонд пластиковый (полипропилен), тампон хлопковый, длина: 150 мм (ПУ № РЗН 2021/15079) ²	Тампон-зонд МиниМед стерильный ТУ 32.50.50-034-29508133-2020: зонд пластиковый (полипропилен), тампон хлопковый, длина: 150 мм (ПУ № РЗН 2021/15079)	150 мм	18 шт.
4.	Вкладыш			1 шт.

1 – далее по тексту «Пробирки Safe-Lock».

2 – далее по тексту «Тампон-зонд».

Таблица 2 – Характеристики компонентов набора реагентов, часть 2

№ п/п	Название компонентов набора	Описание	Объем/масса	Количество в упаковке
1.	Смесь ферментов	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	0,330 ± 0,003 мл	1 пробирка
2.	Реакционная смесь	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	0,792 ± 0,008 мл	1 пробирка
3.	Реакционный буферный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	0,165 ± 0,002 мл	1 пробирка
4.	Краситель	Порошок фиолетового цвета	0,0074 ± 0,0002 г	1 пробирка
5.	Вода деионизированная	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	1,000 ± 0,010 мл	2 пробирки
6.	Положительный контрольный образец «ПКО»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	0,300 ± 0,003 мл	1 пробирка
7.	Отрицательный контрольный образец «ОКО»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	0,300 ± 0,003 мл	1 пробирка
8.	Масло минеральное	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка	1,300 ± 0,017 мл	1 пробирка

Внешний вид реагентов должен соответствовать описанному в таблицах 1 и 2. Не использовать набор в случае нарушения целостности первичной или вторичной упаковки!

Инструкция по применению поставляется в количестве 1 штуки с каждой поставкой набора реагентов вне зависимости от количества заказанных наборов.

Паспорт поставляется в количестве 1 штуки на каждую серию с каждой поставкой набора реагентов вне зависимости от количества заказанных наборов одной серии.

Набор реагентов рассчитан на 60 реакций, включая реакции с контрольными образцами (ОКО и ПКО).

Аналитические характеристики

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) набора реагентов

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) набора реагентов составляет 10^5 копий ГЭ/мл SARS-CoV-2.

Аналитическая специфичность

Интерференция не наблюдалась при исследовании образцов, содержащих в повышенных концентрациях муцин (до 5 % по объему), водный раствор хлоргексидина биглюконата 0,05 % (до 0,5 % по объему), раствор Люголя 1 % (до 0,1 % по объему), гемоглобин (до 1 % по объему).

Перекрестная реактивность не наблюдалась при исследовании образцов, содержащих образцы нуклеиновых кислот аденовируса типа 5, коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), вируса гриппа типа А H1N1, H5N1 и В, вируса парагриппа типа 1, коронавирус человека типа OC43, респираторно-синцитиального вируса (PCV), метапневмовируса человека, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza type b*, *Legionella pneumophila*, *Rhinovirus*, ДНК человека.

Неспецифических реакций при анализе образцов нуклеиновых кислот микроорганизмов с концентрацией в образце не менее 10^5 копий ГЭ/мл не выявлено. Таким образом, аналитическая специфичность набора реагентов составляет 100 %.

Воспроизводимость

Внутри серии – 100 %;

Между сериями – 100 %.

Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность составила 100 %, (ДИ: 96,84 – 100 %, с ДВ 95 %) при 115 положительных образцах.

Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность составила 100 %, (ДИ: 96,95 – 100 %, с ДВ 95 %) при 119 отрицательных образцах.

Меры предосторожности при работе с набором реагентов

Набор реагентов использовать только для диагностики *in vitro*.

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность коронавирусом SARS-CoV-2 проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологическими требованиями по профилактике инфекционных болезней (СанПиН 3.3686-21), санитарно-эпидемиологическим

правил, СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПин 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», методических указаний «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09), временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» (Временные МР 2019-nCoV), а также «Временных методических рекомендаций по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

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.

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

При работе с набором реагентов следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом;
- избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов следует немедленно обратиться за медицинской помощью;
- все работы следует проводить только с использованием одноразовых наконечников с аэрозольным барьером для полуавтоматических дозаторов. Для каждого образца, содержащего нуклеиновые кислоты (в том числе контролей), использовать отдельный наконечник;

– при работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007;

– перед началом работы необходимо ознакомиться с пользовательскими инструкциями на используемое оборудование и комплекты реагентов. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкций;

– при работе с биологическими образцами и положительным контрольным образцом следует соблюдать особую осторожность, так как их разбрызгивание может привести к контаминации и, как следствие, к ложноположительным результатам;

– при удалении отходов не допускать открывания пробирок с продуктами амплификации и их разбрызгивания, так как это может привести к контаминации рабочих поверхностей и оборудования;

– все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ-287-113;

– при работе с набором реагентов следует использовать защитную одежду: перчатки, халат, маску, шапочку;

– при нарушении целостности упаковки набор реагентов должен быть утилизирован согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 287-113;

– с образцами до и после фиксации, и всеми контактирующими с ними материалами, следует обращаться как с разносчиками инфекции и утилизировать их с должной предосторожностью.

Набор реагентов применять строго по назначению.

Общие рекомендации и меры предосторожности при проведении анализа:

– добавлять образцы, содержащие нуклеиновые кислоты (испытуемые образцы, положительный контрольный образец) в отдельном помещении или боксе, используя специально предназначенный для этого набор дозаторов;

– при отборе и добавлении образцов, содержащих нуклеиновые кислоты, особенно положительный контрольный образец, избегать образования аэрозоля;

– погружать наконечник дозатора в растворы на минимальную глубину;

– размораживать замороженные реактивы при комнатной температуре до полной разморозки;

– пробирки с размороженными реактивами перед использованием перевернуть 10 раз, избегая образование пены, а затем центрифугировать в течение 2-3 секунд на настольной миницентрифуге для пробирок.

При использовании набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест» по назначению и согласно перечисленным мерам безопасности и в соответствии с инструкцией, набор безопасен. Входящие в состав набора реагентов компоненты не содержат потенциально инфекционный материал.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-изотест» не подлежит использованию, если не соблюдались условия транспортирования и хранения.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-изотест» не подлежит использованию по истечению срока годности.

Описание изделий, не входящих в состав набора, предусмотренных для использования:

Оборудование:

- термостат для пробирок типа «эппендорф» с диапазоном регулирования температуры от температуры окружающей среды (плюс 18-22 °C) до плюс 99 °C (например, «TDB-120», BioSan, Латвия);

- бокс биобезопасности (например, БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 NEOTERIC (221.150), ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

- холодильник от плюс 2 до плюс 8 °C с морозильной камерой не выше минус 18 °C;

- штативы изотермические для поддержания заданных температур для пробирок объемом от 0,2 мл до 2,0 мл (например, IsoFreeze ООО «НПФ Хеликон», Россия);

- центрифуга до 3000 об/мин с вортексом (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия, «Microspin 12», Biosan, Латвия).

Материалы и реагенты:

- пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл (например, SSI, США);

- одноразовые прозрачные полипропиленовые пробирки с защелкивающейся крышкой объемом 0,2 мл или стрипованные пробирки объемом 0,2 мл с крышками (например, «Bio-Rad», США);

- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США);

- фильтровальная бумага белого цвета (например, «Мелиор XXI», Россия).

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

- средства индивидуальной защиты в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21;

- комплект средств для обработки рабочего места, емкость с дезинфицирующим раствором;

– штативы для пробирок объемом 0,2, 1,5 и 2,0 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

Дозирующие устройства:

– набор автоматических дозаторов переменного объема до 10 мкл, до 100 мкл или до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия);

– таймер – специализированный тип часов, используемый для измерения определенных временных интервалов при проведении анализа;

– контейнер для биологических отходов – изделия, предназначенные для сбора органических и биологических отходов.

Допускается использование изделий другого типа, по своим характеристикам не уступающее рекомендуемому.

Порядок отбора и подготовки проб

Тип исследуемых проб

Биологическим материалом для исследования являются: материал, полученный при взятии мазка со слизистой ротоглотки.

Образцы хранятся в холодильнике при температуре плюс 2 – плюс 6 °С не более суток. При длительном хранении (до 4 месяцев) образцы требуется хранить при минус 18 – минус 22 °С. Перед анализом образцы должны быть полностью разморожены и доведены до комнатной температуры. Повторное замораживание и оттаивание биоматериала не допускается!

Процедура получения и обработки биологического материала

Для проведения анализа забор проб осуществляют в соответствии с требованиями временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» (Временные МР 2019-nCoV).

Взятие диагностического материала осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранении и транспортировке согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и «Временными рекомендациями по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV», направленными в адрес органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере охраны здоровья Роспотребнадзором письмом от 21.01.2020 № 02/706-2020-27.

Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию и его хранение до проведения исследований проводят в соответствии с требованиями

временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)» (Временные МР 2019-nCoV) и «Временных методических рекомендаций по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

Образцы хранятся в холодильнике при температуре плюс 2 – плюс 6 °С не более суток. При длительном хранении (до 4 месяцев) образцы требуется хранить при минус 18 – минус 22 °С.

Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя тяжелой острой респираторной инфекции COVID-19, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СанПиН 3.3686-21) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности. Клинический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами (СанПиН 2.1.3684-21).

Проведение ПЦР исследования

Обязательно выполнение этапов анализа в указанном порядке.

Подготовительные операции

1. Включить твердотельный термостат на плюс 65 °С.
2. Лизирующий буферный раствор из части 1 набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест», реакционную смесь, реакционный буферный раствор, деионизированную воду, отрицательный контрольный образец «ОКО», положительный контрольный образец «ПКО», краситель и минеральное масло из части 2 набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест» разморозить при комнатной температуре.

3. Приготовление раствора красителя. В пробирку «Краситель» внести 2,0 мл воды из пробирок «Вода деионизированная». Перевернуть пробирку 5 раз. Выдержать раствор красителя 30 мин при комнатной температуре. Далее вортиксировать раствор в течение 10 секунд и центрифугировать 3-5 секунд при 2000 об/мин или перевернуть пробирку 10 раз при отсутствии вортекса. Готовый раствор хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 6 месяцев.

4. Рассчитать объем V компонентов согласно количеству реакций с учетом погрешности дозирования по формуле:

$$V = V_1 \times (3 \text{ повтора на каждый образец} + 3 \text{ «ОКО»} + 3 \text{ «ПКО»}) \times 1,1,$$

где V_1 – объем компонента на 1 реакцию (таблица 3).

ВНИМАНИЕ! При расчете следует учитывать, каждая серия экспериментов должна сопровождаться постановкой трех отрицательных и трех положительных контролей.

Таблица 3 – Объем компонентов для приготовления итоговой смеси для постановки реакции

Наименование компонента	V_1 компонента на 1 реакцию, мкл	V компонента на 60 реакций, мкл	V компонента на 9 реакций, мкл	V компонента на __ реакций, мкл	V компонента на __ реакций, мкл
Смесь ферментов	5,0	330,0	49,5		
Реакционная смесь	12,0	792,0	118,8		
Реакционный буферный раствор	2,5	165	24,75		
Раствор красителя	0,5	33,0	4,95		

Необходимый для проведения исследования объем жидких компонентов отобрать в пробирки, не входящие в набор.

Все реагенты готовы к применению.

Экстракция РНК

1. Отобрать необходимое количество пробирок Safe-Lock, входящих в набор. Один набор реагентов рассчитан на анализ 20 образцов, включая положительный и отрицательный контроли. Внести в каждую пробирку по 200 мкл «Лизирующего буферного раствора». Промаркировать пробирки.

2. В пробирки с лизирующим буферным раствором внести тампон-зонд для взятия мазков из ротоглотки с биологическим образцом. Один образец – одна пробирка. Тампон-зонд обрезать, крышку закрыть.

3. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд. Прогреть пробирки в термостате в течение 10 минут при плюс 65 °С.

4. Перемешать на вортексе в течение 10 секунд. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК, готовую к постановке реакции.

5. Отобрать надосадочную жидкость, содержащую очищенную РНК, в отдельную пробирку с защелкивающейся крышкой объемом 0,2 мл, не входящую в набор.

Очищенная РНК может храниться до 1 недели при температуре от минус 18 до минус 22 °С.

Проведение изотермической амплификации

1. Включить твердотельный термостат на плюс 63 °С.

2. Пробирки с отобранным раствором красителя, «Реакционную смесь», «Реакционный буферный раствор», «ПКО», «ОКО» вортиксировать 5 секунд и центрифугировать в течение 5 секунд при 2000 об/мин или перемешать пипетированием в течение 15 секунд. Поместить в изотермический штатив.

3. Для приготовления раствора для амплификации в чистую пробирку типа «эппендорф» объемом 1,5 мл, не входящую в состав, внести «Реакционную смесь», «Реакционный буферный раствор», «Смесь ферментов», раствор красителя в объеме, рассчитанном в таблице 3.

ВНИМАНИЕ! Смешивание всех компонентов реакции проводить только в охлажденном при плюс 4 °С изотермическом штативе.

4. Готовый раствор вортиксировать 5 секунд и центрифугировать 5 секунд при 2000 об/мин или перемешать пипетированием в течение 15 секунд.

ВНИМАНИЕ! Приготовленный раствор не хранить!

ВНИМАНИЕ! Проводить этап работы, избегая попадания прямых солнечных лучей на растворы, содержащие краситель.

5. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл с защелкивающимися крышками или стрипованных пробирок объемом 0,2 мл с крышками, для проведения исследования, включая положительный и отрицательный контроли. Внести в каждую пробирку по 20 мкл приготовленного раствора для амплификации. Промаркировать пробирки. Поместить пробирки в изотермический штатив.

6. В три пробирки с раствором для амплификации внести по 5 мкл «ОКО» (отрицательный контроль), перемешать пипетированием. В каждую пробирку внести по 1 капле (20 мкл) «Масла минерального» для предотвращения испарения реакционной смеси, закрыть пробирки.

7. В пробирки с раствором для амплификации внести по 5 мкл очищенной РНК (три повтора на один образец). В одну пробирку вносят только один образец.

Перемешать пипетированием. В каждую пробирку внести по 1 капле (20 мкл) «Масла минерального» для предотвращения испарения реакционной смеси, закрыть пробирки.

8. В три пробирки с раствором для амплификации внести по 5 мкл «ПКО» (положительный контроль), перемешать пипетированием. В каждую пробирку внести по 1 капле (20 мкл) «Масла минерального» для предотвращения испарения реакционной смеси, закрыть пробирки.

9. Пробирки с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями поместить в термостат на плюс 63 °С

и инкубировать в течение 45 минут. Далее увеличить температуру реакции до плюс 80 °С и инкубировать в течение 2 минут для инактивации ферментов.

10. Извлечь пробирки из термостата, остудить при комнатной температуре в течение 5 мин.

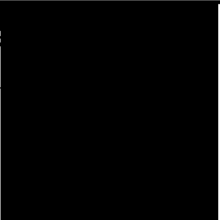
Анализ результатов амплификации

Анализ результатов проводят визуально. Пробирки осматривают на матово-белом фоне или фильтровальной бумаге при рассеянном дневном свете.

В пробирках, содержащих положительный контрольный образец, реакционная смесь после проведения амплификации должна окраситься в голубой цвет (в 3/3 повторов), в соответствии с таблицей 4 (положительный результат).

В пробирках, содержащих отрицательный контрольный образец, реакционная смесь после проведения амплификации должна окраситься в фиолетовый цвет (в 3/3 повторов), в соответствии с таблицей 4 (отрицательный результат).

Таблица 4 – Интерпретация результатов колориметрической изотермической полимеразной цепной реакции

Положительный результат	Отрицательный результат
	

Принцип интерпретации результатов:

– РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена, если реакционная смесь с исследуемым образцом имеет голубой цвет в 3/3 повторов;

– РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена (или ее содержание в образце ниже предела обнаружения, или отсутствует), если реакционная смесь с исследуемым образцом имеет фиолетовый цвет в 3/3 повторов;

– результат анализа является валидным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации в 3/3 повторов соответственно;

– результат анализа принять не валидным, если положительный и/или отрицательный контроль и/или исследуемые пробы имеют нехарактерные цвета хотя бы в одном из повторов. Необходимо повторить исследование с этапа постановки колориметрической изотермической полимеразной цепной реакции с использованием ранее полученной

очищенной РНК. При получении повторных не валидных результатов переделать исследование с новым набором.

Определение валидности результатов колориметрической изотермической полимеразной цепной реакции приведено в таблице 5.

Таблица 5 – Определение валидности результатов

Положительный контроль	Отрицательный контроль	Исследуемый образец	Результат
+	–	+	Положительный
+	–	–	Отрицательный
–	+		Невалидный, необходимо переделать анализ
–	–		Невалидный, необходимо переделать анализ
+	+		Невалидный, необходимо переделать анализ

Полученный результат должен интерпретироваться врачом в совокупности с другими подтверждающими исследованиями.

Ограничения метода

Только для диагностики *in vitro*.

Набор реагентов состоит из 2 частей, для проведения исследования необходимо использовать реагенты из части 1 и части 2 одного набора реагентов.

В случае разлива или порчи какого-либо из компонентов набора рекомендуется взять новый набор реагентов. Замена компонентов одной упаковки набора реагентов компонентами из другой коробки набора реагентов запрещена.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-изотест» применим только для анализа препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из биологического материала.

Количество РНК, содержащееся в препарате нуклеиновых кислот, выделенных из биологического материала, может быть ниже количества РНК, соответствующего пределу обнаружения набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест», что может стать причиной получения ложноотрицательных результатов.

Набор реагентов «SARS-CoV-2-изотест» применим только для оценки наличия РНК коронавируса SARS-CoV-2, но не для оценки статуса всех

остальных вирусов, которые могут содержаться в исследуемом препарате нуклеиновых кислот.

Анализ с помощью набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест» является качественным тестом и не предназначен для количественного определения вирусной нагрузки.

Набор реагентов не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

ВНИМАНИЕ! К работе с набором реагентов «SARS-CoV-2-изотест» и анализу результатов амплификации не допускается персонал с дефицитом цветовосприятия.

Условия транспортирования и хранения

Особенности транспортирования и хранения набора реагентов должны учитываться на всех этапах работы: хранении, перевозке, применении и утилизации (уничтожении) данного набора реагентов.

Условия транспортирования

Транспортировать наборы реагентов следует всеми видами транспорта на двух температурных режимах: часть 1 – при температуре от плюс 2 °С до плюс 6 °С, часть 2 – при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в холодильных камерах или с хладагентами, обеспечивающими регламентированный температурный режим, с ежедневной регистрацией температуры.

Изделия, транспортированные с нарушением условий транспортирования, применению не подлежат.

Хранение

Набор реагентов в упаковке следует хранить на складе в морозильных камерах на двух температурных режимах: часть 1 – при температуре от плюс 2 °С до плюс 6 °С, часть 2 – при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С. Не допускается размораживание набора реагентов до его использования.

Реагенты после вскрытия также необходимо хранить на двух температурных режимах: часть 1 – при температуре от плюс 2 °С до плюс 6 °С, часть 2 – в морозильных камерах при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С. После разморозки и использования, оставшиеся объемы реагентов необходимо снова заморозить сразу после приготовления раствора для амплификации. В ходе работы допускается не более 9 циклов заморозки/разморозки.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты изготовления при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

Срок годности вскрытых реагентов

Срок годности вскрытых реагентов составляет 6 месяцев.

Утилизация

Утилизации подлежат все наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов, остатков наборов реагентов после проведения анализа следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 287-113.

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

Неиспользованные компоненты набора, в том числе при истекшем сроке годности, относятся к классу А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам.

После использования, а также при нарушении целостности упаковки, компоненты набора относятся к отходам класса Б и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов. Все компоненты набора, содержащие потенциально опасные материалы, перед уничтожением должны быть обеззаражены в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

Утилизации должна подлежать вся упаковка, в том числе и транспортная. Утилизации должны подвергаться отдельно бумага, полиэтилен и пластмасса.

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

Экологические и физические риски при соблюдении методов утилизации отсутствуют.

Гарантии производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие заявленных характеристик набора реагентов требованиям данной инструкции при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящей инструкцией по применению.

По вопросам, касающимся рекламаций и обращения набора реагентов «SARS-CoV-2-изотест», следует обратиться в Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации (ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ), по адресу 195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4, тел. +7 (812)-775-02-41, +7 (812)-775-02-48, gniiivm_2@mil.ru.

Информация о первоначальном выпуске эксплуатационной документации
Введено впервые.

Библиографические ссылки

1. Новикова И. А., Генетическая характеристика вируса SARS-CoV-2 // «Живые и биокосные системы». – 2021. – № 35;

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



– Предел температуры



– Обратитесь к инструкции по применению



– Дата изготовления



– Использовать до



– Медицинское изделие для диагностики in vitro

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ССЫЛОЧНО-НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

Приказ № 526 от 06.08.2007 г.	Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации
ГОСТ Р 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 ин витро. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики ин витро для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р 52905-2007	Лаборатории медицинские. Требования безопасности
СанПиН 3.3686-21	Санитарно-эпидемиологическими требованиями по профилактике инфекционных болезней
СанПин 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
МУ-287-113	Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности
Временные МР 2019-nCoV	Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)
Временные МР 2019-nCoV ПЦР	Временных методических рекомендаций по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Прошито и пронумеровано на 12 (двадцати) листах
и скреплено печатью

Врио начальника ГНИИИ ВМ МО РФ

