

Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» по ТУ 21.20.23-184-09286667-2022

АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	6
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 SARS-CoV-2 TRIO, K2 SARS-CoV-2 TRIO	7
2.4. Техническое обслуживание и ремонт	7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	7
3.1. Внутренний контроль качества	7
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	8
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	11
6.1. Взятие исследуемого материала	11
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала	11
6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов	11
6.4. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	13
7.1. Мазки из полости носа	13
7.2. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки.....	14
7.3. Мокрота.....	14
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала	15
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР	15
8.3. Внесение проб РНК, проведение ОТ-ПЦР и детекции	17
8.4. Анализ и вычисление результатов	18
8.5. Интерпретация результатов	18
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению.....	20
8.7. Диагностическое значение полученного результата.....	21
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	21
9.1. Предел обнаружения.....	21
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	21
9.3. Аналитическая специфичность	21
9.4. Повторяемость и воспроизводимость измерения.....	22
9.5. Правильность измерения	24
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	24
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ.....	25
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	26
10.1. Срок годности	26
10.2. Транспортирование.....	26
10.3. Хранение	26
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	26
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	27

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
кДНК	– комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
K1	– калибровочный образец 1
K2	– калибровочный образец 2
K-	– отрицательный контрольный образец ОТ-ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ОТ-ПЦР	– обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
ТУ	– технические условия
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНКаза	– рибонуклеаза
РУ	– регистрационное удостоверение
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» по ТУ 21.20.23-184-09286667-2022.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» предназначен для выявления и количественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) в биологическом материале (мазках со слизистой носо- и ротоглотки, мокроте) методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом ОТ-ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для скринингового исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекции респираторного тракта и для мониторинга терапии COVID-19. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

1.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор выпускается в двух формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы предназначены для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции РНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ОТ-ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ОТ-ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь SARS-CoV-2 TRIO	1,2	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер С	0,65	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Тaq полимераза	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
K1 SARS-CoV-2 TRIO	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 SARS-CoV-2 TRIO	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
BKO R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	1 пробирка	Отрицательный контроль экстракции. Прозрачная жидкость.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь SARS-CoV-2 TRIO	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) ¹	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
Буфер D	1,2	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Тaq полимераза	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
K1 SARS-CoV-2 TRIO	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 SARS-CoV-2 TRIO	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, калибратор. Прозрачная жидкость.
BKO R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	1 пробирка	Отрицательный контроль экстракции. Прозрачная жидкость.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде ² на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

¹ Пробирки с голубым парафином не используются.

² Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО R), последующим проведением реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса, кДНК ВКО R и ДНК человека с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО R позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. Выявление ДНК человека позволяет контролировать качество взятия биологического материала.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ревертазы и последующая амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение РНК SARS-CoV-2 основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста, амплификация кДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO – образцами с известной концентрацией мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации мишени в исследуемых образцах.

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводится 5 реакций – амплификация участков генов RdRp, N и E коронавируса SARS-CoV-2, а также ВКО R и глобина человека. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ³	Cy5
НК-мишень	ВКО R	РНК SARS-CoV-2	ДНК человека
Область амплификации	Искусственно синтезированная последовательность	RdRp, N, E ген	Глобин человека

³ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 SARS-CoV-2 TRIO, K2 SARS-CoV-2 TRIO

Измерение значений концентрации калибраторов K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

2.4. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контроль экстракции (ОКО), а каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

В качестве отрицательного контроля используется реагент ОКО, входящий в состав набора. Отрицательный контроль тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться РНК SARS-CoV-2. В случае несоответствия результата для контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль (К-) тестируется, начиная с этапа ОТ-ПЦР, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться РНК SARS-CoV-2. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2, и контроля, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

В качестве положительных контролей этапа ОТ-ПЦР используются реагенты K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации РНК коронавируса SARS-CoV-2 в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO. Исследование калибровочных образцов K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ОТ-ПЦР. Определение концентрации РНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов K1 SARS-CoV-2 TRIO и K2 SARS-CoV-2 TRIO и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если эффективность калибровки выходит за пределы граничных значений, необходимо повторить исследование с этапа ОТ-ПЦР.

3.1.3. Контроль ингибирования

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и затем амплификация κДНК коронавируса SARS-CoV-2 и внутреннего контрольного образца (ВКО R). ВКО R добавляется в каждый образец биологического материала на этапе экстракции РНК. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена РНК SARS-CoV-2 и ВКО R, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции. В исследуемых образцах, в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2, допускается наличие или отсутствие ВКО R.

Для оценки качества забора биоматериала предусмотрено использование эндогенного ВКО (ДНК человека), который присутствует в каждом исследуемом образце, содержащем клинический материал. Если в исследуемых образцах не обнаружен эндогенный ВКО, необходимо обратить внимание на качество забора материала.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории регламентированными моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению РНК SARS-CoV-2.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО R, входящим в состав набора. Без использования ВКО R невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Перед началом работ следует ознакомиться с Методическими указаниями МУ 1.3.1877-04 «Порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторного анализа биологического материала от больных (и умерших) пациентов с подозрением на тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)», утвержденными Роспотребнадзором.

5.2. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». В соответствии с СанПиН 3.3686-21 диагностика возбудителей инфекционных болезней II группы патогенности молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с ПБА III-IV группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных 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». Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.3. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал⁵, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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.

- 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.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

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

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор 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. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁵ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

5.4. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

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

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

5.7. Набор реагентов не выявляет наличие коронавируса SARS-CoV-2, если его концентрация ниже заявленного предела обнаружения (5×10^2 копий/мл).

5.8. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортировки и хранения мазков со слизистой носо- и ротоглотки, содержащая раствор фосфатного буфера с добавлением консерванта и криоконсерванта (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков «АмплиПрайм ТСР», РУ № ФСР 2012/14200 или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд-тампон, предназначенный для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек (полости носа, ротоглотки) однократного применения, стерильный. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.1.3. Емкость для взятия, хранения и транспортировки мокроты, однократного применения, стерильная, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой, изготовленная из полипропилена.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции РНК.

6.2.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для предобработки мокроты, – согласно инструкции к используемому реагенту.

6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции РНК, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять РНК из биологического материала (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота) для последующего исследования методом ОТ-ПЦР;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции РНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной РНК в объеме не менее 100 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошел набор реагентов для экстракции РНК «МагноПрайм ФАСТ-Р» (РУ № РЗН 2020/12971).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции РНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции РНК.

6.4. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов (при работе с формой выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при работе с формой выпуска 1 в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного либо планшетного типа, зарегистрированные в РФ и соответствующие следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G и Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РУ № РЗН 2019/8446), С1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки;
- мокрота.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как один образец. Для этого берут мазки разными зондами сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец. Если зонд не остается в пробирке со средой, то необходимо тщательно смыть материал, интенсивно прокручивая зонд в среде не менее 10 секунд.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Мазки из полости носа

Взятие материала провести из полости носа с помощью одноразового стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °C) – в течение 72 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 14 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 3 месяцев;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие материала провести с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 72 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 14 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3. Мокрота

7.3.1. Взятие материала

Отобрать мокроту в количестве не менее 1,0 мл в одноразовый стерильный контейнер с широким горлом и завинчивающейся крышкой.

Условия хранения и перевозки материала:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3.2. Предварительная обработка

Необходимо провести разжижение мокроты, используя реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции нуклеиновых кислот, в соответствии с инструкцией по использованию данного реагента.

Условия хранения предварительно обработанных проб мокроты аналогичны условиям хранения материала до предобработки.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории⁶:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции РНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции РНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО R – **10 мкл** в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца⁷ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции РНК, – **100 мкл** (согласно инструкции по применению к используемому набору для экстракции РНК).

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы и Реввертазы R при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

⁶ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁷ Для образцов мокроты требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь SARS-CoV-2 TRIO	10,0*(N+1)	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер С	5,0*(N+1)	
Тақ полимеразы	1,0*(N+1)	
Реввертаза R	0,25*(N+1)	

8.2.1.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами, осадить капли на вихрексе.

8.2.1.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вихрексе.

8.2.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

ВНИМАНИЕ! Необходимо минимизировать время нахождения Тақ полимеразы и Реввертазы R при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

8.2.2.1. Рассчитать объемы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 6). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
Буфер D	10,0*(N+1)	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Тақ полимеразы	1,0*(N+1)	
Реввертаза R	0,25*(N+1)	

8.2.2.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **Буфером D, Тақ полимеразой и Реввертазой R**, осадить капли на вихрексе.

8.2.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вихрексе.

8.2.2.4. Отобрать необходимое количество стрипов с **ПЦР-смесью SARS-CoV-2 TRIO** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.2.5. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.2.6. На поверхность парафина внести по **10 мкл** приготовленной **реакционной смеси**, при этом она не должна проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб РНК, проведение ОТ-ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы:

При проведении качественного анализа:

а) положительный контроль ОТ-ПЦР – в одну пробирку для образца **K2** внести **10 мкл K2 SARS-CoV-2 TRIO**.

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ОТ-ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

При проведении количественного анализа:

а) Образец **K1** – в одну пробирку внести **10 мкл K1 SARS-CoV-2 TRIO**.

б) Образец **K2** – в одну пробирку внести **10 мкл K2 SARS-CoV-2 TRIO**.

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ОТ-ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после внесения РНК-проб и контролей в реакционную смесь.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 7).

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, Cy5	

8.3.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.3.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.7. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по трем каналам детекции (см. таблицу 8).

Таблица 8

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	Cy5
Продукт амплификации	ВКО R	PHK SARS-CoV-2	ДНК человека

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 9 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлен в таблицах 10 и 11 соответственно.

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении качественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и R6G не определено или определено выше граничного ⁸	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ, начиная с этапа экстракции
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G не определено, а по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 определено не выше граничного	PHK SARS-CoV-2 не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G не определено, по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного, а по каналу для флуорофора Cy5 не определено или определено выше граничного	PHK SARS-CoV-2 не обнаружена ДНК человека ниже референсного значения
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено не выше граничного. Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 не учитывается	PHK SARS-CoV-2 обнаружена

Таблица 10

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и R6G не определено или определено выше граничного ⁸	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ, начиная с этапа экстракции
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G не определено, а по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 определено не выше граничного	PHK SARS-CoV-2 не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G не определено, по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного, а по каналу для флуорофора Cy5 не определено или определено выше граничного	PHK SARS-CoV-2 не обнаружена ДНК человека ниже референсного значения
Рассчитанное значение концентрации PHK по каналу для флуорофора R6G меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора. Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 не учитывается	PHK SARS-CoV-2 обнаружена в концентрации менее 1×10^3 копий/мл
Рассчитанное значение концентрации PHK по каналу для флуорофора R6G находится в пределах линейного диапазона измерения набора. Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 не учитывается	PHK SARS-CoV-2 обнаружена в концентрации $X \times 10^y$ копий/мл
Рассчитанное значение концентрации PHK по каналу для флуорофора R6G выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора. Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и Cy5 не учитывается	PHK SARS-CoV-2 обнаружена в концентрации более 1×10^8 копий/мл

⁸ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
	FAM	R6G	Cy5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного ⁹	Значение Ct отсутствует	Допустимо значение Ct не ниже граничного
К- (отрицательный контроль ОТ-ПЦР)	Значение Ct отсутствует		Допустимо значение Ct не ниже граничного
K1 SARS-CoV-2 TRIO (K1)	Не учитывается	Определено значение Ct	Не учитывается
K2 SARS-CoV-2 TRIO (K2)	Не учитывается	Определено значение Ct не выше граничного	Не учитывается
K1 SARS-CoV-2 TRIO (K1) K2 SARS-CoV-2 TRIO (K2)	—	Показатель эффективности (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2	—

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct), по каналу для флуорофора Cy5 определено значение порогового цикла (Ct) ниже граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, R6G определено значение порогового цикла (Ct), по каналу для флуорофора Cy5 определено значение порогового цикла (Ct) ниже граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации.

8.6.3. Если показатель эффективности E для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции РНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование образца.

⁹ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения¹⁰

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 12).

Значения характеристики, указанные в таблице 12, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Предел обнаружения набора

Мишень	Биоматериал	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл		
			участок RdRp гена	участок N гена	участок E гена
PHK SARS-CoV-2	Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	5×10^2	$4,13 \times 10^2 - 7,08 \times 10^2$	$4,02 \times 10^2 - 6,74 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2 - 7,30 \times 10^2$
PHK SARS-CoV-2	Мокрота	5×10^2	$4,07 \times 10^2 - 6,55 \times 10^2$	$4,16 \times 10^2 - 6,05 \times 10^2$	$3,93 \times 10^2 - 6,14 \times 10^2$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» дает линейный ответ, приведен в таблице 13. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 13

Линейный диапазон измерения набора

Биологический материал	Линейный диапазон измерения, копий/мл
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$
Мокрота	

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» обнаруживает только фрагменты PHK коронавируса SARS-CoV-2.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 14) и геномной ДНК человека. НК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл, и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие вирус SARS-CoV-2.

¹⁰ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация кДНК выявляемого возбудителя, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Betacoronavirus</i> 1 OC43 (ATCC® VR-1558™)
<i>Bordetella pertussis</i>	Quantitative Synthetic <i>Human coronavirus</i> NL63 RNA (ATCC® VR-3263SD™)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Вирус гриппа А (H5N1) (штамм А/Н1ВGR-14)
<i>Haemophilus influenza</i>	Вирус гриппа А (H3N2) (штамм А/Гонконг/4801/14)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Вирус гриппа А (H0N1) (штамм А/Киев/3304/84)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Вирус гриппа А (H2N2) (штамм А/Ленинград/549/80)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Вирус гриппа А (H7N9) (штамм А/Шанхай/2/2013)
<i>Legionella pneumophila</i>	Вирус гриппа В (штамм В/Пхукет/3073/13)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Вирус гриппа В (штамм В/Брисбен/46/15 (В-15))
<i>Human coronavirus</i> 229E (ATCC® VR-740™)	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов, вирусов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Повторяемость и воспроизводимость измерения

Повторяемость и воспроизводимость измерений оценивали путем тестирования модельных образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 в четырех концентрациях (см. таблицу 15-18).

Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих РНК SARS-CoV-2, на ТЕ-буфере с poly(A). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию РНК, ОТ-ПЦР и детекцию результатов).

Таблица 15

Повторяемость измерения на пределе обнаружения набора

Мишень	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, Ct_{cp}	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма выпуска 1				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	5×10 ²	38,63	0,67	1,73
участок N гена вируса SARS-CoV-2		38,64	0,67	1,73
участок E гена вируса SARS-CoV-2		38,63	0,67	1,73
Форма выпуска 2				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	5×10 ²	38,62	0,68	1,76
участок N гена вируса SARS-CoV-2		38,63	0,68	1,75
участок E гена вируса SARS-CoV-2		38,62	0,68	1,75

Повторяемость измерения в пределах линейного диапазона набора

Мишень	Концентрация, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log ₁₀	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма выпуска 1				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,47	0,09	2,65
	3×10 ⁵	5,54	0,09	1,58
	3×10 ⁷	7,38	0,08	1,12
участок N гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,47	0,10	2,82
	3×10 ⁵	5,54	0,08	1,40
	3×10 ⁷	7,37	0,08	1,02
участок E гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,47	0,08	2,35
	3×10 ⁵	5,58	0,08	1,52
	3×10 ⁷	7,34	0,09	1,25
Форма выпуска 2				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,42	0,09	2,74
	3×10 ⁵	5,58	0,09	1,53
	3×10 ⁷	7,47	0,08	1,13
участок N гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,40	0,10	2,97
	3×10 ⁵	5,55	0,10	1,84
	3×10 ⁷	7,43	0,09	1,25
участок E гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,40	0,09	2,51
	3×10 ⁵	5,62	0,17	3,00
	3×10 ⁷	7,45	0,09	1,21

Таблица 17

Воспроизводимость измерения на пределе обнаружения набора

Мишень	Концентрация, копий/мл	Среднее значение порогового цикла, Ct _{cp}	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма выпуска 1				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	5×10 ²	38,80	0,92	2,37
участок N гена вируса SARS-CoV-2		38,78	0,91	2,36
участок E гена вируса SARS-CoV-2		38,70	0,80	2,06
Форма выпуска 2				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	5×10 ²	38,78	0,92	2,36
участок N гена вируса SARS-CoV-2		38,78	0,95	2,44
участок E гена вируса SARS-CoV-2		38,71	0,80	2,07

Таблица 18

Воспроизводимость измерения в пределах линейного диапазона набора

Мишень	Концентрация, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log ₁₀	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма выпуска 1				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,50	0,09	2,50
	3×10 ⁵	5,56	0,09	1,66
	3×10 ⁷	7,39	0,08	1,12
участок N гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,48	0,09	2,73
	3×10 ⁵	5,57	0,08	1,49
	3×10 ⁷	7,39	0,08	1,07

Мишень	Концентрация, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log ₁₀	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
участок E гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,49	0,08	2,32
	3×10 ⁵	5,60	0,08	1,37
	3×10 ⁷	7,36	0,09	1,28
Форма выпуска 2				
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,47	0,11	3,23
	3×10 ⁵	5,59	0,08	1,46
	3×10 ⁷	7,43	0,09	1,25
участок N гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,45	0,13	3,78
	3×10 ⁵	5,56	0,10	1,86
	3×10 ⁷	7,39	0,08	1,13
участок E гена вируса SARS-CoV-2	3×10 ³	3,46	0,11	3,20
	3×10 ⁵	5,62	0,17	2,98
	3×10 ⁷	7,42	0,10	1,28

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 120 повторах (см. таблицу 19).

Таблица 19

Правильность измерения

Мишень	Среднее значение измерения, log ₁₀	Установленное значение концентрации, log ₁₀	Систематическая погрешность (В)	
			log ₁₀	%
участок RdRp гена вируса SARS-CoV-2	5,67	5,7	0,02	0,4
участок N гена вируса SARS-CoV-2	5,68		0,02	0,4
участок E гена вируса SARS-CoV-2	5,69		0,01	0,1

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» были использованы 200 образцов мазков со слизистой носо- и ротоглотки и 80 образцов мокроты.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие или отсутствие РНК SARS-CoV-2 использовался набор реагентов «АмплиСенс® COVID-19-FL» (ПУ № РЗН 2021/14026).

Результаты тестирования набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» в сравнении с набором сравнения приведены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO	Набор сравнения АмплиСенс® COVID-19-FL
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	200	Положительных	100	100
		Отрицательных	100	100
Мокрота	80	Положительных	40	40
		Отрицательных	40	40

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 21.

Таблица 21

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO»

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	100 % (96,38 – 100) %	100 % (96,38 – 100) %
Мокрота	100 % (91,19 – 100) %	100 % (91,19 – 100) %

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом материале, на эффективность ОТ-ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам мазков из носо- и ротоглотки и образцам мокроты на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 22, в максимально возможной концентрации для данных видов биоматериала.

Таблица 22

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента
Мазки со слизистой носо- и ротоглотки	гемоглобин	2,0 ммоль/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	хлоргексидин	0,1 %
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	ксилометазолин	0,01 %
	ДНК человека	1,0×10 ⁷ копий/мл
Мокрота	гемоглобин	2,0 ммоль/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	хлоргексидин	0,1 %
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	ДНК человека	1,0×10 ⁷ копий/мл

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах не более 5 суток. Набор реагентов при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор реагентов необходимо разуккомплектовать. Контрольные образцы (K1 SARS-CoV-2 TRIO, K2 SARS-CoV-2 TRIO, ВКО R и ОКО) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Остальные реагенты хранить в морозильной камере при температуре от -24 до -16 °С в течение всего срока годности набора. ПЦР-смесь SARS-CoV-2 TRIO хранить в защищенном от света месте. Допустимо размораживать и замораживать реагенты не более 3 раз. Необходимо минимизировать время нахождения Taq полимеразы и Ревертазы R при комнатной температуре.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из реагентов, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 TRIO» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Код партии



Дата изготовления



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению



Не допускать попадания солнечного света



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению