

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» по ТУ 21.20.23-083-09286667-2020

«АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
1.1. Область применения	4
1.2. Показания к применению	4
1.3. Противопоказания к применению	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	7
2.3. Техническое обслуживание и ремонт	8
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	8
3.1. Внутренний контроль качества	8
3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования	8
3.1.2. Контроль ингибирования	9
3.1.3. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации	9
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	10
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	13
6.1. Взятие исследуемого материала	13
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала	13
6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов	13
6.4. Обратная транскрипция, амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	14
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	15
7.1. Мазки из полости носа	16
7.2. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	16
7.3. Мокрота	16
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	17
8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала	17
8.1.1. Ручная методика экстракции	17
8.1.2. Автоматическая методика экстракции	17
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР	18
8.2.1. При использовании формы выпуска 1	18
8.2.2. При использовании формы выпуска 2 и 4	19
8.2.3. При использовании формы выпуска 3	20
8.3. Внесение проб РНК, проведение ОТ-ПЦР и детекции	20
8.4. Анализ и вычисление результатов	21
8.5. Интерпретация результатов	22
8.6. Возможные ошибки	23
8.7. Диагностическое значение полученного результата	24
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	24
9.1. Предел обнаружения	24
9.2. Аналитическая специфичность	24
9.3. Прецизионность (повторяемость и воспроизводимость измерения)	25
9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	25
9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ	25
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	28
10.1. Срок годности	28
10.2. Транспортирование	28
10.3. Хранение	28
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	28
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	30

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
«АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO»	– Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» по ТУ 21.20.23-083-09286667-2020
ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
кДНК	– комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ПК	– положительный контроль экстракции РНК, обратной транскрипции и ПЦР, включает фрагмент РНК SARS-CoV-2
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец (отрицательный контроль экстракции)
ОТ-ПЦР	– обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНКаза	– рибонуклеаза
РУ	– регистрационное удостоверение
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» по ТУ 21.20.23-083-09286667-2020 предназначен для качественного обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале (мазках со слизистой носо- и ротоглотки, мокроте) при диагностике лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания с подозрением на инфекцию COVID-19 или лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний и не являющихся контактными с больными COVID-19 методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

1.1. Область применения

Набор используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекции респираторного тракта. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.2. Показания к применению

Набор используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекции верхних и нижних дыхательных путей, вызванных коронавирусом SARS-CoV-2, ассоциированным с тяжелым острым респираторным синдромом. Материал может быть получен также от бессимптомных лиц.

1.3. Противопоказания к применению

Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в четырёх формах. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно. Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией 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 ПЦР, раскапанную под прослойку парафина в пробирки объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 2 и 4 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 – 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Формы предназначены для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитаны на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Формы могут быть использованы как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 3 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина в стрипованные (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробирки объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 DUO	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана под парафин.
Буфер D	1,2	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.
Тақ полимераза	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Тақ и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль этапа ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
ПКО SARS-CoV-2 DUO	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец с концентрацией последовательности РНК SARS CoV-2, пятикратно превышающей предел обнаружения набора ¹ . Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	2 пробирки	Отрицательный контроль этапа экстракции РНК. Прозрачная жидкость.

¹ Относительная концентрация ПКО SARS-CoV-2 DUO указана на этапе ОТ-ПЦР.

Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 DUO	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 полимеразы	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Тaq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль этапа ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
ПКО SARS-CoV-2 DUO	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец с концентрацией последовательности РНК SARS CoV-2, пятикратно превышающей предел обнаружения набора ² . Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	2 пробирки	Отрицательный контроль этапа экстракции РНК. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 DUO	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) ³	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 полимеразы	0,12	1 пробирка	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Тaq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,03	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,2	1 пробирка	Отрицательный контроль этапа ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
ПКО SARS-CoV-2 DUO	0,15	1 пробирка	Положительный контрольный образец с концентрацией последовательности РНК SARS CoV-2, пятикратно превышающей предел обнаружения набора ² . Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	2 пробирки	Отрицательный контроль этапа экстракции РНК. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 4			
ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 DUO	0,6	2 пробирки	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер С	0,3	2 пробирки	Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния. Прозрачная жидкость.

² Относительная концентрация ПКО SARS-CoV-2 DUO указана на этапе ОТ-ПЦР.

³ Пробирки с голубым парафином не используются.

Тaq полимераза	0,06	2 пробирки	Раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,015	2 пробирки	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
К-	0,2	2 пробирки	Отрицательный контроль этапа ОТ-ПЦР. Прозрачная жидкость.
ПКО SARS-CoV-2 DUO	0,15	2 пробирки	Положительный контрольный образец с концентрацией последовательности РНК SARS CoV-2, пятикратно превышающей предел обнаружения набора ⁴ . Прозрачная жидкость.
ВКО R	1,2	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,2	4 пробирки	Отрицательный контроль этапа экстракции РНК. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1,2,3 или 4)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1
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: http://www.nextbio.ru/passport/	1

2.2. Принцип метода

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

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 Таq-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

⁴ Относительная концентрация ПКО SARS-CoV-2 DUO указана на этапе ОТ-ПЦР.

непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов 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 проводятся 3 реакции – амплификация кДНК участка гена ORF1a и S гена коронавируса SARS-CoV-2, а также амплификация последовательности кДНК ВКО R. Результаты амплификации кДНК SARS-CoV-2 и кДНК ВКО R регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие кДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁵
кДНК-мишень	кДНК ВКО R	кДНК SARS-CoV-2
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	ORF1a, S ген

2.3. 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 контрольный образец (ОКО) и положительный контроль (ПКО SARS-CoV-2 DUO). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контроль (К-). Результаты для

⁵ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться кДНК 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 кДНК SARS-CoV-2, и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль (К-) тестируется, начиная с этапа ОТ-ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться кДНК 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 кДНК SARS-CoV-2, и контроля (К-), начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля этапа экстракции и ОТ-ПЦР используется реагент ПКО SARS-CoV-2 DUO, входящий в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительного контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и затем амплификация кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и внутреннего контрольного образца (ВКО R). ВКО R добавляется в каждый образец биологического материала на этапе экстракции РНК. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО R, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и ПЦР.

3.1.3. 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 моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

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 и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

4.5. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные 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 п.924 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 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, упаковку⁶, биологический материал⁷, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁷ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

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 «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.

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 (1×10^3 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 изотонический водно-солевой раствор с консервантом.

6.1.2. Зонд-тампон для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек (полости носа, ротоглотки) одноразовый стерильный из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком.

6.1.3. Емкость для взятия, транспортировки и хранения мокроты (объемом до 50 мл), 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 НК.

6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов

6.3.1. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017) – в случае ручной методики экстракции, «МагноПрайм ЮНИ» (РУ № РЗН 2019/8955) – в случае автоматической экстракции.

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 РНКаз/ДНКаз, следующих видов:

- 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 РНКаз/ДНКаз, 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 раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа (например, Rotor-Gene Q), либо планшетного типа (например, QuantStudio 5 или C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96), зарегистрированные в РФ и соответствующие следующим требованиям:

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

- 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 $2^\circ\text{C}/\text{сек}$;
- скорость охлаждения не менее $1^\circ\text{C}/\text{сек}$.

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

Для исследования рекомендуется брать не менее двух типов биологического материала:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки (при наличии симптомов поражения верхних дыхательных путей),
- мокрота (при наличии симптомов поражения нижних дыхательных путей).

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, 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 из полипропилена/полистирола с вискозой или хлопком в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, содержащую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается только 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 из полипропилена/полистирола с вискозой или хлопком в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, содержащую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в 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 завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 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 лаборатории⁸:

- 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) и положительного контроля (ПКО SARS-CoV-2 DUO) в одном повторе.

ВНИМАНИЕ! При проведении экстракции РНК во все образцы, включая контрольные (ОКО и ПК), следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО R).

8.1.1. Ручная методика экстракции.

Экстракцию РНК проводить с использованием набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» в соответствии с инструкцией по его применению. В процессе экстракции РНК использовать следующие объемы реагентов, контрольных образцов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁹ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО R – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента ПКО SARS-CoV-2 DUO – **10 мкл** в пробирку для ПК + **90 мкл ОКО**;
- объем реагента, используемого для элюции РНК, – **50 мкл** (допускается при необходимости увеличение объема элюции до **90 мкл**).

8.1.2. Автоматическая методика экстракции.

Экстракцию РНК проводить с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» в соответствии с инструкцией по его применению.

⁸ 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».

⁹ Для образцов мокроты требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

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

- объем исследуемого образца¹⁰ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО R – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента ПКO SARS-CoV-2 DUO – **10 мкл** в пробирку для ПК + **90 мкл ОКО**;
- объем реагента, используемого для элюции РНК, – **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! Допускается предварительное смешивание исследуемых и контрольных образцов (ОКО и ПК) с Буфером L за пределами автоматической станции. Приготовление смеси МГС, Реагента А и ВКО R в соответствии с инструкцией к набору реагентов «МагноПрайм ЮНИ» и ее добавление к исследуемым и контрольным образцам в Буфере L осуществляется на борту автоматической станции.

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

8.2.1. При использовании формы выпуска 1.

8.2.1.1. Рассчитать объемы для 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.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

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

8.2.1.2. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL SARS-CoV-2 DUO** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

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

8.2.1.4. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами (Буфер D, Тақ полимераза и Ревертаза R), осадить капли на вортексе.

¹⁰ Для образцов мокроты требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

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

8.2.1.6. 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.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2 и 4.

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

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

8.2.2.1. Рассчитать объемы для 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.

Таблица 6

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

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

8.2.2.2. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое всех реагентов, осадить капли на вортексе.

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 вортексе

8.2.2.4. 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».

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.3. При использовании формы выпуска 3.

8.2.3.1. Рассчитать объемы для реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 7). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 7

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

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

8.2.3.2. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью-FL SARS-CoV-2 DUO** для проведения ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных образцов.

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

8.2.3.4. Разморозить реагенты. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с реагентами (Буфер D, Тақ полимераза и Ревертаза R), осадить капли на вортексе.

8.2.3.5. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.3.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.3.6. Внести на поверхность парафина 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! Программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) положительный контроль ОТ-ПЦР – в одну пробирку для образца **ПК** внести **10 мкл пробы РНК, экстрагированной из ПКО SARS-CoV-2 DUO**.

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

в) отрицательный контроль 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 8).

Таблица 8

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 ¹¹	

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

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager версии 2.0 или выше (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/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с

¹¹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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 двум каналам детекции (см. таблицу 9).

Таблица 9

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G
Продукт амплификации	кДНК ВКО R	кДНК SARS-CoV-2

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 10 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если получены правильные результаты для контролей в соответствии с таблицей 11;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager версии 2.0 или выше (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/>. Алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, используемый в программном обеспечении, представлен в таблицах 10 и 11 соответственно.

Таблица 10

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и R6G отсутствует или определено выше граничного ¹²	Результат невалидный
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM	Результат сомнительный

¹² Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Результат	Интерпретация
определено меньше граничного, и значение Ct по каналу R6G определено выше граничного	
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено или отсутствует, и значение Ct по каналу R6G определено не выше граничного	РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено меньше граничного, и значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует	РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена

Таблица 11

Результаты для контролей

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct определено меньше граничного	Значение Ct отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует	Значение Ct отсутствует
ПК (положительный контроль экстракции РНК, ОТ-ПЦР)	Значение Ct определено меньше граничного	Значение Ct определено меньше граничного

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM и R6G отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить исследование для всех отрицательных и сомнительных образцов (начиная с этапа экстракции РНК).

8.6.2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора R6G и/или FAM. 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 ПЦР-исследование для всех образцов.

8.6.3. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора R6G. 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 ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

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 забор и исследование биологического материала.

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 обнаружения¹³

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 10). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Мишень	Предел обнаружения, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
участок гена ORF1a вируса SARS-CoV-2	1×10^3	$6,91 \times 10^2 - 1,53 \times 10^3$
участок S гена вируса SARS-CoV-2	1×10^3	$4,36 \times 10^2 - 1,36 \times 10^3$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» обнаруживает фрагменты РНК только SARS-CoV-2.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 13) 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.

¹³ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация кДНК SARS-CoV-2, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Influenza A virus</i> (H3N2)
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Influenza A virus</i> (H0N1)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Influenza A virus</i> (H2N2)
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Influenza A virus</i> (H7N9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Influenza B virus</i> (штамм В/Пхукет/3073/13)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Influenza B virus</i> (штамм В/Брисбен/46/15 (В-15))
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Human coronavirus</i> 229E
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Betacoronavirus</i> 1 OC43
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Human coronavirus</i> NL63
<i>Influenza A virus</i> (H5N1)	-

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

9.3. Прецизионность (повторяемость и воспроизводимость измерения)

Повторяемость и воспроизводимость измерений оценивали путем тестирования модельных образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 в двух концентрациях.

Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих РНК SARS-CoV-2, на ТЕ-буфере с poly(A). Были протестированы образцы в двух концентрациях РНК SARS-CoV-2, одна из которых соответствовала пределу обнаружения набора (1000 копий/мл), а вторая двукратно превышала предел обнаружения (2000 копий/мл). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию РНК, ОТ-ПЦР и детекцию результатов). Для оценки повторяемости тестирование образцов в концентрации 1000 копий/мл проводилось в 120 повторах, 2000 копий/мл - в 48 повторах, для оценки воспроизводимости – в 180 и 72 повторах соответственно.

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов (для РНК SARS-CoV-2), не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов (для РНК SARS-CoV-2), не превышал 10 %.

9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностических характеристик набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» были использованы положительные и отрицательные образцы мазков из носо- и ротоглотки и мокроты (см. таблицы 14 и 15).

При тестировании форм выпуска 1, 2, 3 в качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие или отсутствие РНК SARS-CoV-2, использовалась форма выпуска 4 набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» по ТУ 21.20.23-083-09286667-2020 (ПУ № РЗН 2020/10837).

Таблица 14

Результаты тестирования образцов биологического материала с использованием форм выпуска 1, 2, 3

Форма выпуска набора	Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
	Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO	Набор сравнения
1, 2, 3	Мазки из носо- и ротоглотки	132	Положительных	66	66
			Отрицательных	66	66
	Мокрота	112	Положительных	56	56
			Отрицательных	56	56
			Отрицательных	66	66

При тестировании формы выпуска 4 в качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие или отсутствие РНК SARS-CoV-2, использовался набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2» (ПУ № РЗН 2020/9765).

Таблица 15

Результаты тестирования образцов биологического материала с использованием формы выпуска 4

Форма выпуска набора	Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
	Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO	Набор сравнения
4	Мазки из носо- и ротоглотки	132	Положительных	66	66
			Отрицательных	66	66
	Мокрота	112	Положительных	56	56
			Отрицательных	56	56

Значения диагностической специфичности и чувствительности набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 16.

Диагностические характеристики набора

Форма выпуска набора	Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
1, 2, 3	Мазки из носо- и ротоглотки	100 % (94,56 % – 100 %)	100 % (94,56 %– 100 %)
	Мокрота	100 % (93,62 % – 100 %)	100 % (93,62 % – 100 %)
4	Мазки из носо- и ротоглотки	100 % (95,60 % – 100 %)	100 % (95,60 %– 100 %)
	Мокрота	100 % (94,80 % – 100 %)	100 % (94,80 % – 100 %)

9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ОТ-ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® SARS-CoV-2 DUO» 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 17, в максимально возможной концентрации для данных видов биоматериала.

Таблица 17

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
мазки из носо- и ротоглотки, мокрота	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества в 100 мкл
	хлоргексидин	0,5 % действующего вещества в 100 мкл

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 3 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 (ПКО SARS-CoV-2 DUO, 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-FL SARS-CoV-2 DUO хранить в защищенном от света месте. Допустимо размораживать и замораживать реагенты не более 3 раз.

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 смеси реагентов, входящих в состав набора, 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 DUO» 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 регулируемую 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