



616-4 2022-02-09



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

SARS-CoV-2/SARS-CoV

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2020/9948 от 13 июля 2021 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ	5
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	14
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	16
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	17
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	26
9	УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	27
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	29
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	30
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	30
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	30
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	31
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	32
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	33
	Приложение А.....	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV	- Severe acute respiratory syndrome coronavirus (коронавирус, вызывающий острый респираторный синдром)
SARS-CoV-2	- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус, вызывающий острый респираторный синдром 2), эквивалентные названия COVID-19 virus, 2019-nCoV, Wuhan seafood market pneumonia virus
COVID-19	- COrona VIRus Disease 2019, коронавирусное заболевание 2019
nCoV	- novel coronavirus, новый коронавирус
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
ИВ	- интерферирующие вещества
НК	- нуклеиновые кислоты
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ВК	- внутренний контроль
К-	- отрицательный контрольный образец

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Набор реагентов предназначен для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего коронавирусную инфекцию COVID-19, в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- 1.3** Функциональное назначение: диагностика *in vitro* (выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале человека).
- 1.4** Показания к проведению исследования:
- лица с симптомами ОРВИ и контактировавшие с заболевшим COVID-19, независимо от их возраста;
 - лица всех возрастов без признаков ОРВИ (в очагах инфекции/в условиях распространения инфекции) с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.
- 1.5** Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.6** Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике, безопасность работы лабораторий должна быть обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.
- 1.7** Потенциальные пользователи: квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 1.8** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R3-P436-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R3-P436-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R3-P436-XA/X, фасовка А, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации Стрим	Прозрачная светлорозовая жидкость	4 стрипа по 8 пробирок	по 72 мкл
ОТ-ПЦР-буфер Стрим	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,2 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R3-P436-VA/X, фасовка А, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для ОТ-ПЦР Стрим	Прозрачная светлорозовая жидкость	4 пробирки	по 1,2 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R3-P436-N3/9, фасовка N			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для ОТ-ПЦР	Прозрачная светлорозовая жидкость	1 пробирка	1,3 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 96 определений для фасовок S и N (рекомендуется проводить не более 12 постановок) и 384 определения для фасовки А (одна постановка на 384 образца или две постановки по 192 образца), включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: обратная транскрипция РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК проводят в одной пробирке.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина (для фасовки S) или использования Таq-полимеразы, блокированной антителами (для фасовок А, N). Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина или температурной диссоциации комплекса Таq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав набора реагентов включен внутренний контрольный образец РНК-ВК "А", который предназначен для оценки этапа выделения РНК и качества прохождения полимеразной цепной реакции.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК коронавируса подобных SARS-CoV, включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК коронавируса SARS-CoV-2 (ген E), включена флуоресцентная метка Rox.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК коронавируса SARS-CoV-2 (ген N), включена флуоресцентная метка Cy5.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта внутреннего контрольного образца, включена флуоресцентная метка Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке, одновременно.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
Коронавирусы, подобные SARS-CoV	БК*	Коронавирус SARS-CoV-2, ген E	Коронавирус SARS-CoV-2, ген N	-

* Внутренний контрольный образец РНК-БК "А"

Исследование состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификация кДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV.

Реагенты для выделения РНК не включены в состав набора. Выделение РНК проводят с использованием наборов реагентов, зарегистрированных в установленном порядке в Российской Федерации.

2.3 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

Поскольку нельзя исключить возникновения новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2, для повышения надежности диагностики в качестве мишеней выбраны три участка генома: специфичные для коронавируса SARS-CoV-2 участки гена N и гена E, а также консервативный участок гена E, общий для группы коронавирусов подобных SARS-CoV (включая SARS-CoV и SARS-CoV-2).

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта по каналам детекции Fam/Green, Rox/Orange и Cy5/Red.

В образцах биологического материала человека, не содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2 и не содержащих РНК коронавирусов подобных SARS-CoV, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат амплификации внутреннего контроля по каналу Hex/Yellow, и отрицательный результат амплификации специфического продукта по каналам Fam/Green, Rox/Orange и Cy5/Red.

В образцах биологического материала, не содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2, в которых содержится РНК коронавирусов подобных SARS-CoV (SARS coronavirus (различные изоляты); а также Bat SARS-like coronavirus (различные изоляты); Bat SARS coronavirus (различные изоляты); SARS-like coronavirus (различные изоляты); SARS-related coronavirus (различные изоляты); Rhinolophus affinis coronavirus; Coronavirus BtRs-BetaCoV), детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта по каналу детекции Fam/Green и отрицательный результат амплификации специфического продукта, по каналам Rox/Orange и Cy5/Red.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК Influenza A virus, Influenza B virus, Human coronavirus HKU-1,

Human coronavirus NL-63, Human rhinovirus, ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, а также ДНК человека в концентрации до 10^8 копий/мл образца.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец нуклеиновой кислоты, по результатам анализа рисков и проведения НИОКР отнесены следующие вещества: гемоглобин, присутствующий в препарате РНК в результате неполного удаления в ходе выделения РНК из образца биоматериала, содержащего примесь крови, а также изопропиловый спирт и метилацетат, остающиеся в образце РНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца РНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца РНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца РНК.

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты, в том числе содержащиеся в назальных спреях и др. удаляются в ходе выделения НК с использованием комплектов/наборов реагентов для пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения нуклеиновых кислот, позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения нуклеиновых кислот.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения: 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку для фасовки S; 6 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку для фасовок A, N.

Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений двух серий лабораторного контрольного образца (ЛКО).

Предел обнаружения РНК в образце биоматериала зависит от метода пробоподготовки образца и конечного объёма препарата выделенной РНК (объёма элюции).

Предел обнаружения 10 копий НК на амплификационную пробирку (для фасовки S) и 6 копий НК на амплификационную пробирку (для фасовок A, N)

соответствует следующим значениям концентрации РНК в образце при использовании комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

№	Выявляемый показатель	ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-S	ПРОБА-МЧ-НК (объем полученного препарата 50 мкл)
1	Коронавирусы, подобные SARS-CoV	500 коп/мл образца	2000 коп/мл образца
2	Коронавирус SARS-CoV-2, ген E	500 коп/мл образца	2000 коп/мл образца
3	Коронавирус SARS-CoV-2, ген N	500 коп/мл образца	2000 коп/мл образца

3.4 Диагностические характеристики

Количество исследований (n) – 192.

Диагностическая чувствительность (95% ДИ) – 100% (95,6 – 100%);

Диагностическая специфичность (95% ДИ) – 100% (96,7 – 100%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Коронавирус SARS-CoV-2 отнесен ко II группе патогенности. Класс потенциального риска применения набора реагентов: 3 (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 N 4н).

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 обязаны обеспечивать безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Согласно МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19»:

Организация лабораторной диагностики COVID-19 осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства по работе с микроорганизмами II групп патогенности. К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость,

обеспечивая требования в соответствии с таблицей методических рекомендаций МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19».

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II группы патогенности.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Медицинские работники, которые собирают или транспортируют клинические образцы в лабораторию, должны быть обучены практике безопасного обращения с биоматериалом, строго соблюдать меры предосторожности и использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ).

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Выделение РНК следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

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

Дозаторы, используемые при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки и ОТ-ПЦР, образующиеся в клиничко-диагностических лабораториях, относятся к классу В и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09.

Опасные компоненты в наборе реагентов.

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасных компонентов	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	-
Смесь для ОТ-ПЦР Стрим		
Смесь для ОТ-ПЦР		
ОТ-ПЦР-буфер		
ОТ-ПЦР-буфер Стрим		
Фермент Taq/RT		
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	Азид натрия менее 0,1%	является безопасным для конечного пользователя
Смесь для амплификации Стрим		
Положительный контрольный образец		

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Применять набор реагентов строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV требуются следующие оборудование и материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка А	Фасовка N
ПЦР-бокс	да	да	да
детектирующий амплификатор планшетного типа, например, «ДТпрайм *М*», «ДТлайт», «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология»), или CFX96 (Bio-Rad)	да	нет	да
детектирующий амплификатор «ДТпрайм *Х*» (ООО «НПО ДНК-Технология»)	нет	да	нет
детектирующий амплификатор роторного типа, например, прибор Rotor-Gene Q (QIAGEN)	да ¹	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	да	да
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	нет	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	нет	да
штатив для дозаторов	да	нет	да
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	нет	да
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или пробирки стрипованные объемом 0,2 мл и крышки к пробиркам стрипованным, свободные от РНКаз и ДНКаз	нет	нет	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
дозирующее устройство ДТстрим 12М1 или ДТстрим 15М1 и одноразовые наконечники с фильтром для устройства дозирующего ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл	да ²	нет	нет
дозирующее устройство ДТстрим 12М4 или ДТстрим 15М4 и одноразовые наконечники с фильтром для устройства дозирующего ДТстрим, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл	нет	да	нет
устройство для запечатывания планшет ДТпак (ООО «НПО ДНК-Технология»)	нет	да	нет
Центрифуга с RCF не ниже 500 x g, с адаптером для микропланшетов	нет	да	нет
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да	нет
микропланшет 384 лунки	нет	да	нет
¹ - для фасовки S, пробирки ² - для фасовки S, стрипы			

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка А	Фасовка N
Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения НК:			
бокс биологической безопасности II-III класса;		да	
термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный, и пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, или термостат твердотельный, поддерживающий температуру до 65 °С, и пробирки объемом 1,5 мл с защелкивающимися крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes		да	
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;		да	
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора		да	
центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF не ниже 12 000 x g		да	
микроцентрифуга-вортекс		да	
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 0,2-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл		да	
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл		да	
штатив для дозаторов		да	
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл		да	
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;		да	
транспортная среда		да	
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов		да	
дезинфицирующее средство		да	
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала (рекомендуется Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в комплектации ПРОБА-НК , производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867 или Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) по ТУ 9398-088-46482062-2016 в варианте исполнения ПРОБА-МЧ-НК (фасовка А) , производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2017/5753) для автоматизированной пробоподготовки или Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК-S) по ТУ 21.20.23.117-117-46482062-2020, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11296)		да	

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки из носоглотки и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокроту.

6.2 Особенности взятия биоматериала, в соответствии с МР 3.1.0169-20

"Лабораторная диагностика COVID-19" от 30.03.2020

Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную ёмкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей методических рекомендаций.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемого материала, в соответствии с соответствием с МР 3.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19" от 30.03.2020

Таблица 2 – Условия транспортирования и хранения биоматериала

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспортирование	Условия хранения до транспортирования	Комментарии
Мазок из носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков**	4 °С	≤5 дней: 4 °С >5 дней*: -70 °С	Носоглоточные и орофарингеальные тампоны должны быть помещены в одну пробирку для увеличения вирусной нагрузки
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов *: -70 °С	Возможно небольшое разведение образца
Эндотрахеальный аспират, аспират носоглотки или смыв из носа	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов *: -70 °С	
Мокрота	Стерильный контейнер	4 °С	≤48 часов: 4 °С >48 часов *: -70 °С	Убедитесь, что материал поступает из нижних дыхательных путей

* при невозможности обеспечить хранение при минус 70 °С, образцы хранить при минус 20 °С.

** для транспортировки образцов используют транспортную среду для хранения и транспортировки респираторных мазков или физиологический раствор (при условии транспортировки до лаборатории не более 24 часов после взятия образца) или сухой зонд-тампон (при условии транспортировки до лаборатории не более 4 часов после взятия образца).

Комментарий – рекомендуется использовать транспортные среды, содержащие консерванты, например, СТОР-Ф производства ООО «ДНК-Технология ТС» или аналогичные, зарегистрированные в установленном порядке, предназначенные для дальнейшего исследования образцов методом ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! Диапазон вирусной нагрузки SARS-CoV-2 может варьировать в широких пределах от очень низких значений (10^4 и менее копий/мл) в биоматериале от лиц с бессимптомным носительством и лиц на стадии выздоровления до крайне высоких значений (более 10^9 копий/мл) в биоматериале от пациентов с клинической картиной острой вирусной пневмонии. В связи с этим, при выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации биоматериалом в лаборатории рекомендуется выполнение следующих правил:

1. Необходимо проводить визуальную оценку поступившего биоматериала и выбраковку всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.
2. По возможности выделять в отдельный поток образцы от пациентов из стационара с симптомами острой инфекции и анализировать их отдельно от остальных образцов (биоматериал для скрининга контактировавших лиц и пациентов с легким течением заболевания). Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательно выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.
3. Обязательно выполнять постановку отрицательных контрольных образцов, начиная с этапа выделения РНК, в каждом протоколе.
4. Использовать на всех этапах исследования наконечники с аэрозольными фильтрами.
5. Четко соблюдать методику выполнения исследования, открывать пробирки типа Эппендорф при помощи пинцета (не допускать касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки); при внесении реагентов не касаться наконечником пробирки (если это произошло, сразу заменить наконечник).

7.1 Выделение РНК

Для выделения РНК из мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата, мокроты используют комплекты для выделения РНК, зарегистрированные в РФ в установленном порядке (см. таблицу 3).

Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Объем полученного препарата РНК должен составлять не более 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! Полученный препарат РНК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Допускается однократное замораживание и хранение препарата РНК при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток.

Таблица 3 - Наборы реагентов, валидированные для выделения РНК для дальнейшего исследования набором реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV

Набор реагентов, РУ	Комплектация	Биоматериал
Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ №ФСР 2010/08867 от 13.10.2019	ПРОБА-НК	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота
	ПРОБА-НК (укороченная методика в соответствии с Приложением А)	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2017/5753	ПРОБА-МЧ-НК (фасовка А)	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала "РИБО-преп" по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ №ФСР 2008/0314	РИБО-преп	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК-S) по ТУ 21.20.23.117-117-46482062-2020, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11296	ПРОБА-НК-S	Мазки из носоглотки, ротоглотки

7.1.1 Особенности предобработки биоматериала при исследовании на наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2

ВНИМАНИЕ! В ходе подготовки мазков из носоглотки и зева (ротоглотки), взятых в пробирку с транспортной средой, образцов бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата предварительное центрифугирование не требуется.

Для выделения используется **100** мкл образца.

7.1.2 Использование контрольных образцов на этапе выделения нуклеиновых кислот

Внутренний контрольный образец

Для исключения ложноотрицательных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно добавление **внутреннего контрольного образца** в клинические образцы на этапе выделения нуклеиновых кислот.

В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК необходимо использовать **внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" из набора реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV.**

РНК-ВК "А" следует использовать **в объеме 10 мкл на образец**.

Примечание - Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) и внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) из комплекта реагентов ПРОБА-НК при выделении РНК не используют.

Отрицательный контрольный образец

Для исключения ложноположительных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно использование **отрицательного контрольного образца** с этапа выделения нуклеиновых кислот.

На этапе выделения нуклеиновых кислот обязательно подготовить **отрицательный контрольный образец** и провести его через все этапы выделения одновременно с выделением РНК из клинических образцов.

В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего комплекта реагентов, в объеме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

7.2 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка S, стрипы, Фасовка S, пробирки

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (K+) и отрицательного контрольного образца (K-).

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку для «K+» и одну пробирку для «K-». Общее количество пробирок – 8.

7.2.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 15 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «K+» и «K-».

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT для 9 (8+1) пробирок, т.е. 135 мкл ОТ-ПЦР-буфера + 4,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.2.4 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирки с приготовленной смесью «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.

7.2.6 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-НК необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом РНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную РНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед использованием следующего. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл полученного из образцов препарата РНК.

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 10 мкл положительного контрольного образца

7.2.9 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

7.2.10 Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

7.2.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблицах 4 - 5.

При использовании приборов серии ДТ: добавьте в протокол тест «SARS2,SARS_RNA-IC», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ОТ-ПЦР.

Таблица 4 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

№ /Cycling	Температура, °C /Temperature	Время /Hold Time, sec	Количество циклов /Cycle Repeats
Cycling	32 deg	1200	1 time
Cycling 2	95 deg	300	1 time
Cycling 3	94 deg	10	50 times
	60 deg ✓	15	

✓- режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (Fam), Yellow (Hex), Orange (Rox) и Red (Cy5) при 60 °C

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad)

№ блока (Step)	Температура, °C	Время мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	35	20:00	1
2	95	5:00	1
3	94	0:15	50
4	64 ✓	0:20	

✓- режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam, Hex, Rox, и Cy5 при 64 °C

Примечание: Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объём реакционной смеси и т.п.) в приборах серии ДТ, можно загрузить в виде готового файла.

7.3 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием дозирующего устройства ДТстрим. Фасовка S, стрипы

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.3.1 Промаркируйте по одной стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К-).

7.3.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT. Следуйте указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим или смешайте в отдельной пробирке:

- 15 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество исследуемых образцов с учетом «К+» и «К-».

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.3.4 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирки с приготовленной смесью «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.3.5 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.6 Установите пробирки: со смесью «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT», с исследуемыми образцами и контрольными образцами, а также стрипы со смесью для амплификации на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.7 Закройте крышки стрипов.

7.3.8 Центрифугируйте стрипы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе или на центрифуге для микропланшет 96 лунок при 500 x g в течение 30 с.

7.3.9 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл (см. 7.2.11).

7.4 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием дозирующего устройства ДТстрим. Фасовка А, стрипы

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации Стрим!

7.4.1 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер Стрим» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 384 определений одновременно используется две пробирки с ОТ-ПЦР-буфером Стрим и две пробирки с ферментом Taq/RT. Для проведения 192 определений одновременно используется одна пробирка с ОТ-ПЦР-буфером Стрим и одна пробирка с ферментом Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.2 Центрифугируйте стрипы со смесью для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 384 определений одновременно необходимо центрифугировать четыре стрипа со смесью для амплификации Стрим. Для проведения 192 определений одновременно необходимо центрифугировать два стрипа со смесью для амплификации Стрим.

7.4.3 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.4 Установите пробирки или планшеты с образцами РНК на рабочий стол ДТстрим в соответствии с протоколом постановки.

7.4.5 Установите стрипы со смесью для амплификации Стрим, пробирки с ОТ-ПЦР-буфером Стрим, ферментом Taq/RT и положительным контрольным образцом, а также новый микропланшет 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

7.4.6 Откройте стрипы со смесью для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.4.8 Проведите процедуру запечатывания микропланшет 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

- 7.4.9 Центрифугируйте микропланшет 384 лунки при 500 x g в течение 30 с.
- 7.4.10 Поместите микропланшет 384 лунки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл (см. 7.2.11), с использованием файла «SARS2,SARS_A».

7.5 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием дозирующего устройства ДТстрим. Фасовка А, пробирки

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для ОТ-ПЦР Стрим!

7.5.1 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «Смесь для ОТ-ПЦР Стрим» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 384 определений одновременно используется четыре пробирки со смесью для ОТ-ПЦР Стрим и две пробирки с ферментом Taq/RT. Для проведения 192 определений одновременно используется две пробирки со смесью для ОТ-ПЦР Стрим и одна пробирка с ферментом Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.5.2 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.5.3 Установите пробирки или планшеты с образцами РНК на рабочий стол ДТстрим в соответствии с протоколом постановки.
- 7.5.4 Установите пробирки со смесью для ОТ-ПЦР Стрим, ферментом Taq/RT и положительным контрольным образцом, а также новый микропланшет 384 лунки на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.5.5 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.5.6 Проведите процедуру запечатывания микропланшет 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.
- 7.5.7 Центрифугируйте микропланшет 384 лунки при 500 x g в течение 30 с.

7.5.8 Поместите микропланшет 384 лунки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 18 мкл (см. 7.2.11), с использованием файла «SARS2,SARS_A».

7.6 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка N

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для ОТ-ПЦР!

7.6.1 Промаркируйте необходимое количество новых одноразовых амплификационных пробирок объемом 0,2 мл, или пробирок стрипованных объемом 0,2 мл, для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (K+) и отрицательного контрольного образца (K-).

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов; одну пробирку для «K+» и одну пробирку для «K-». Общее количество пробирок – 8.

7.6.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «Смесь для ОТ-ПЦР» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.6.3 Приготовьте смесь фермента Taq/RT со смесью для ОТ-ПЦР. Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 12 x (N+1) мкл смеси для ОТ-ПЦР;
- 0,5 x (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «K+» и «K-».

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь для 9 (8+1) пробирок, т.е. 108 мкл Смеси для ОТ-ПЦР + 4,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.6.4 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирки с приготовленной смесью и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.6.5. Внесите в каждую промаркированную пробирку по 12 мкл приготовленной смеси.

7.6.6 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-НК необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом РНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную РНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед использованием следующего. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.6.7 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6,0 мкл полученного из образцов препарата РНК.

7.6.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.6.9 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

7.6.10 Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

7.6.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 18 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблицах 4 - 5 (см. 7.2.11), с использованием файла «SARS2,SARS_A» для приборов серии ДТ.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 Интерпретация проводится в соответствии с таблицами 6, 7.

Таблица 6 – Интерпретация результатов исследования

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Анализируемые образцы				
Ср/Ct/Cq указан	Не учитывается	Ср/Ct/Cq указан	Ср/Ct/Cq указан	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2¹
Ср/Ct/Cq указан	Не учитывается	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq не указан	Обнаружена РНК коронавирусов, подобных SARS-CoV, РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена
Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq указан	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq не указан	РНК коронавирусов, подобных SARS-CoV, не обнаружена, РНК SARS-CoV-2 не обнаружена
Положительный контрольный образец				
Ср/Ct/Cq указан	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq указан	Ср/Ct/Cq указан	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец				
Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq указан	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq не указан	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

Таблица 7 – Другие возможные результаты

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Анализируемые образцы				
Ср/Ct/Cq ≤ 35	Не учитывается	Ср/Ct/Cq указан	Ср/Ct/Cq не указан	Требуются дополнительные исследования, возможна мутация в одном из генов SARS-CoV-2.
		Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq указан	
Ср/Ct/Cq ≥ 35	Не учитывается	Ср/Ct/Cq ≥ 35	Ср/Ct/Cq не указан	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2¹
Ср/Ct/Cq не указан	Не учитывается	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq ≥ 35	
Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq не указан	Ср/Ct/Cq не указан	Результат недостоверный

Другие результаты исследования интерпретируются как "Результат недостоверный" (9.3).

¹ - не исключено одновременное присутствие в образце РНК коронавируса SARS-CoV-2 и других коронавирусов подобных SARS-CoV

- 9.3** Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из клинического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, либо повторное выделение препарата нуклеиновых кислот, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).
- 9.4** При получении положительного результата амплификации специфического продукта (Cp/Ct/Cq указан) по каналам Fam/Green, Rox/Orange или Cy5/Red в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

ВНИМАНИЕ! При интерпретации результатов исследования рекомендуется применять требования Методических рекомендаций МР 3.1.0169-20 ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА COVID-19.

Предупреждения

Единичный отрицательный результат исследования, особенно если это образец из верхних дыхательных путей, не исключает инфекции. Отбор проб из нижних дыхательных путей должен быть проверен на содержание РНК коронавируса SARS-CoV-2, особенно при тяжелом и прогрессирующим заболевании.

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

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

При получении положительных результатов на коронавирус SARS-CoV-2 на любом из этапов диагностики информация немедленно направляется в региональные органы Роспотребнадзора и Центральный аппарат Роспотребнадзора.

Использование укороченной программы амплификации допускается только для проведения СІТО диагностики.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, смесь для амплификации Стрим, смесь для ОТ-ПЦР Стрим, смесь для ОТ-ПЦР, хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.

10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Пробирки (стрипы) со смесью для амплификации, запечатанной парафином, смесь для амплификации Стрим, смесь для ОТ-ПЦР Стрим, смесь для ОТ-ПЦР, хранить в защищённом от света месте. фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, относятся к классу А и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов по результатам проверки в режиме реального времени при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации:

- Фасовка S – 12 месяцев,
- Фасовка А, Фасовка N – 6 месяцев.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора реагентов		Нестерильно
	Дата изготовления		Одноразовое использование

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документа, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», ООО «ДНК-Технология ТС» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.

адрес: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

1. ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.
2. ООО « ДНК Технология ТС» 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, строение 4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV, следует обращаться по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125 Ж, к. 5, этаж 1, пом.12,, тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Укороченная методика выделения РНК из исследуемого материала (мазки из носоглотки и ротоглотки) с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

Примечание – В случае выпадения осадка в лизирующем растворе флакон следует прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

1. Промаркируйте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл (с защёлкивающимися крышками, если необходимо) с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).
2. Внесите в каждую пробирку по 10 мкл предварительно перемешанного на микроцентрифуге-вортексе внутреннего контрольного образца РНК-ВК "А" из набора реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV.
3. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
4. В пробирки для исследуемых образцов добавьте по 100 мкл исследуемого материала. В пробирку, маркированную «К-», добавьте 100 мкл отрицательного контрольного образца.
5. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
6. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
7. Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
8. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
9. Центрифугируйте пробирки при 12000 - 16000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (18-25 °С).
10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).
11. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
12. Центрифугируйте пробирки при 12000 - 16000 x g в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).
13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).
14. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.
15. Центрифугируйте пробирки при 12000 - 16000 x g в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).
16. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объемом не более 20-30 мкл.
17. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.

18. Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! Использование буфера для растворения из комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС не допускается.

19. Прогретьте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
20. Осадите конденсат центрифугированием при 12000 - 16000 x g в течение 30 с при комнатной температуре (18-25 °С).

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Полученный препарат РНК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Для возможности проведения повторного исследования оставшуюся РНК следует поместить в морозильную камеру и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток, не размораживая до постановки.

ДНК-Технология

117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125 Ж, к. 5, этаж 1, пом.12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)

E-mail: hotline@dna-technology.ru