



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «РеалБест РНК SARS-CoV-2»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «РеалБест РНК SARS-CoV-2» предназначен для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клинических образцах (мазки со слизистой носа и задней стенки глотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Область применения: Набор реагентов используется для выявления РНК SARS-CoV-2 у лиц с симптомами ОРВИ и контактировавших с заболевшим COVID-19, не зависимо от их возраста, лицам всех возрастов без признаков ОРВИ (в очагах инфекции/ в условиях распространения инфекции) с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

Выделение РНК из клинических образцов (мазки со слизистой носа и задней стенки глотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) проводится с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма Bio-Rad, США); «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК коро-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

навируса SARS-CoV-2), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей кДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5'-конца, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством РНК SARS-CoV-2 в образце.

Учёт эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК коронавируса SARS-CoV-2 из клинического материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) Описание.	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС) Лиофилизированная	96 пробирок
Оптическая пленка	1,5 листа

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, определяемая по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-860), составляет 25 копий в ПЦР-пробе (что соответствует 1×10^3 копий/мл исходного образца при использовании для выделения РНК наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест УниМаг»).

3.2. Диагностическая чувствительность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2: клинические испытания, проведенные на 100 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.3. Диагностическая специфичность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.4. Для оценки аналитической специфичности были проведены проверки с потенциально перекрестно-реактивными вирусами (грипп А и В, парагрипп, аденовирусная инфекция, респираторно-синцитиальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека, вызванная hCov NL63, hCov OC43, hCov 229E, hCov HKUI) и микроорганизмами (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*). Перекрестно реагирующих вирусов и микроорганизмов обнаружено не было.

3.5. В наборе для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «РеалБест РНК SARS-CoV-2»2 используются зарегистрированные в установленном порядке набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест экстракция 100) по ТУ 9398-464-23548172-2013 (ПУ № РЗН 2014/1423 от 25.03.2017) или набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест УниМаг) по ТУ 9398-545-23548172-2016 (ПУ № РЗН 2017/5985 от 19.07.2017). Для наборов для выделения РНК «РеалБест экстракция 100» не ожидается интерференции.

3.6. Воспроизводимость результатов: клинические испытания, проведенные на 100 положительных и 100 отрицательных образцах с использованием двух серий набора реагентов, показали 100 % межсерийную воспроизводимость результатов; исследование модельного образца, содержащего РНК SARS-CoV-2 в концентрации 1×10^3 копий/мл, в 10 повторах двумя разными операторами на двух сериях набора показало 100 % внутрисерийную, межпоставочную и межсерийную воспроизводимость результатов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. SARS-CoV-2 (ранее 2019-nCoV) - новый вид коронавирусов, вызывающий опасное инфекционное заболевание COVID-19, относится к II группе патогенности.

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные;
- при удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов;
- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики;
- не использовать набор по истечении срока годности.

4.3. ПКО содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения РНК и постановки ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

4.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.11. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа (с каналами детекции: «FAM», «ROX»):
«CFX96», (фирма «Bio-Rad», США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- ламинарный бокс II класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», фирма Ламинарные системы, Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200 об/мин (например, «PSU-2Т», фирма «BioSan», Латвия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма SSI, США);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и Временными методическими рекомендациями по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденными Главным государственным врачом Российской Федерации 21.01.2020.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения РНК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа используется РНК, выделенная из клинического материала (мазки со слизистой носа и задней стенки глотки, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) с помощью набора «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест УниМаг» согласно инструкции по применению

соответствующего набора.

Для образцов, содержащих слизь (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж), необходимо предварительно провести процедуру подготовки к выделению нуклеиновых кислот. К образцу биоматериала добавить равный объём 95% этилового спирта, тщательно перемешать, выдержать при температуре (18-26) °С 10 минут. Ещё раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот. Не захватывать комки слизи!

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: (1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим. После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной РНК.

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения реакции ОТ-ПЦР (программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору):

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд)*.

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКО и кДНК возбудителя инфекции:

«ROX» – для регистрации сигнала кДНК SARS-CoV-2;

«FAM» – для регистрации сигнала кДНК ВКО.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

– нарастание сигнала амплификации кДНК SARS-CoV-2 (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации по каналу «ROX».

Если для ОКО определяется значение C_t по каналу «ROX», то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим РНК SARS-CoV-2), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, если для этого образца зна-

чение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

Если для анализируемого образца определяется C_t больше 40, рекомендуется проведение дополнительных исследований (исследование вновь забранного материала или исследование с использованием другого набора реагентов).

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °C. Допускается транспортирование при температуре до 26 °C не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °C в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев¹ со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

¹ Не верифицировано данными исследования в режиме реального времени

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест РНК SARS-CoV-2», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу: 630117, г. Новосибирск-117, а/я 492, тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

В.К. Ткачев

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



А.А. Максютов

А.А. Максютов

Информация получена с официальной

Федеральной службы по надзору в сфере

www.goszdramnadzor.ru

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



Масяго Масяго А.В.
2020 г.

Информация получена с официальной сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.roszdravnadzor.ru