



УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО ИПО «Литех»

А.Ю.Наумов

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
ПОЛИВИР SARS-CoV-2

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** предназначен для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (мазка из носа, носоглотки и/или ротоглотки, промывных вод бронхов, полученных при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж), мокроты) взятых у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания с подозрением на инфекцию COVID-19 а также у лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний и не являющихся контактными с больными COVID-2019.

Функциональное назначение – Набор реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** предназначен для диагностики коронавирусной инфекции (выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2).

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** может быть использован для выявления возбудителя коронавирусной инфекции.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клиничко-диагностических лабораторий не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области молекулярно-биологических методов и методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV группы патогенности.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** рассчитан на проведение ОТ-ПЦР - анализа 120 образцов, включая контрольные, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента кДНК, полученной путем проведения обратной транскрипции, методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

Набор реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** выпускается в 2 вариантах исполнения.

Вариант исполнения «Base» содержит реагенты, предназначенные для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Вариант исполнения «Express» дополнен комплектом реагентов, предназначенным для экспрессного выделения РНК (с помощью реагента РНК-ЭКСПРЕСС) из клинического материала, и позволяет проводить весь цикл исследования образца, включающий пробоподготовку и ОТ-ПЦР-анализ.

Таблица 1.

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	«Base»	1. Реакционная смесь 2. Смесь ферментов 3. Разбавитель 4. ВКО 5. ПКО 6. Раствор для восстановления 7. Раствор ЭКС	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 450 мкл 2 пробирки – по 2 мл 1 лиоф пробирка 1 пробирка – 200 мкл 1 пробирка – 2 мл 1 пробирка – 500 мкл
2	«Express»	<u>Комплект реагентов для выделения РНК:</u> 1. Физиологический раствор 2. РНК-ЭКСПРЕСС <u>Комплект реагентов для ОТ-ПЦР-РВ</u> 1. Реакционная смесь 2. Смесь ферментов 3. Разбавитель 4. ВКО 5. ПКО 6. Раствор для восстановления 7. Раствор ЭКС	1 шт. 100 пробирок по 0,5 мл 100 пробирок по 0,2 мл 1 шт. 1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 450 мкл 2 пробирки – по 2 мл 1 лиоф пробирка 1 пробирка – 200 мкл 1 пробирка – 2 мл 1 пробирка – 500 мкл

В состав набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- ОТ-ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома *Сарбековирусов*, содержит флуорофор HEX, зонд для специфического фрагмента генома *SARS-CoV-2*, содержит флуорофор FAM, зонд для внутреннего контроля (искусственная РНК) содержит флуорофор Cy5.
 - праймеры для выявления кДНК *SARS-CoV-2* и *Сарбековирусов*;
 - праймеры для выявления внутреннего контроля (искусственная РНК); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации (ОТ-ПЦР), а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения РНК.

В состав Смеси ферментов входят:

- Таq-полимераза;
- обратная транскриптаза;
- ингибитор рибонуклеаз;
- дитиотрейтол;
- буфер.

ПКО ПОЛИВИР SARS-CoV-2 представляет собой раствор, содержащий защищенные синтетические рекомбинантные фрагменты кДНК коронавируса SARS-CoV-2, сарбековирусов и ВКО.

ВКО представляет собой защищенный синтетический рекомбинантный фрагмент РНК в бактериофаге MS2.

4.2. Принцип метода

Набор реагентов ПОЛИВИР SARS-CoV-2 основан на использовании метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для определения специфических участков РНК коронавируса *SARS-CoV-2* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

Проведение анализа включает 2 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение РНК термокоагуляционным методом).
2. Проведение обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР амплификации и детекцией результатов в режиме «реального времени», в одной пробирке.

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента РНК вируса путем получения ДНК-копии (кДНК) с РНК-матрицы с помощью реакции обратной транскрипции и накопления (амплификации) копий данного фрагмента ДНК-мишени с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени».

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

Для контроля мутаций в целевой последовательности SARS-CoV-2 используется целевая последовательность Сарбековирусов. Сарбековирусы – группа вирусов, состоящая из SARS-CoV-2, SARS-CoV и SARS-подобных вирусов. Параллельное детектирование консервативного участка сарбековирусов необходимо для снижения риска ложноотрицательных результатов в связи с недостаточной изученностью генетического разнообразия SARS-CoV-2. Так как SARS-CoV был элиминирован из вирусов, встречающихся в человеческой популяции, положительный результат по SARS-CoV и отрицательный по SARS-CoV-2 следует рассматривать как вероятно положительный по SARS-CoV-2 и он подлежит дополнительному анализу.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct).

4.4. Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК и ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов, т.е. способность выявлять только РНК указанных вирусов, вне зависимости от присутствия в анализируемом образце НК других возбудителей, доказана при исследовании РНК и ДНК следующих микроорганизмов: *вирус гриппа типа А*, *аденовирус 5 типа*, *вирус денге 1*, *Human coronavirus HCoV-NL63*, *Human coronavirus HCoV-OC43*, *Human coronavirus HCoV-229E*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomonas vaginalis*,

Neisseria gonorrhoeae, Neisseria flava, Neisseria subflava, Neisseria sicca, Neisseria mucosa, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, HSV 1 и 2 muna, CMV, а также геномной ДНК человека.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как частота ложноположительных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

5.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) набора реагентов ПОЛИВИП SARS-CoV-2 составляет 10^3 геном-эквивалентов/мл коронавируса SARS-CoV-2 в образце РНК пробы при выделении набором реагентов «НК-сорбент», и составляет 10^4 геном-эквивалентов/мл коронавируса SARS-CoV-2 в образце РНК пробы при использовании набора реагентов РНК-экспресс.

5.3. - Прецизионность измерения

Внутрисерийная повторяемость Набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией ПОЛИВИП SARS-CoV-2. составила 100%¹.

5.4. Интерферирующие вещества

В наборе для выявления SARS-CoV-2 используется зарегистрированный в установленном порядке набор для выделения РНК «НК-сорбент» (ПУ № РЗН 2019/9331). Для набора реагентов «НК-сорбент» не ожидается интерференции.

Для набора реагентов «РНК-экспресс» не обнаружено влияние муцина (до 5% v/v), цельной крови (5% v/v) для мазков и мокроты на эффективность набора для выявления SARS-CoV-2.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностическая чувствительность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2: 100 % (100 положительных образцов, интервал 96,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2: 100 % (100 отрицательных образцов, интервал 96,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %). Отрицательные образцы содержали возбудители респираторных инфекций: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы, MERS-CoV, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae type B, Legionella pneumophila.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 3.

Коронавирус SARS-CoV-2 отнесен к II группе патогенности.

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2 обязаны обеспечивать 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.

¹ Сведения о межсерийной воспроизводимости изделия будут представлены после выпуска нескольких серий изделия.

- 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, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.
- не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение РНК из исследуемого материала

- Комплект реагентов для выделения РНК (из состава набора **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** для варианта исполнения «**Express**») или Набор реагентов «**НК-сорбент**» (РУ № РЗН 2019/9331) (для варианта исполнения «*Base*»);
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 мкл;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой;
- холодильник для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;

2-й этап - проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с детекцией результатов

- Комплект реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ или набор реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** вариант исполнения «Base»;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- Амплификатор нуклеиновых кислот термоциклический с детекцией сигнала в реальном времени, например Термоциклер CFX96 Touch, «Bio-Rad», США, ФСЗ 2008/03399;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 или 2,0 мл для приготовления амплификационной смеси.
- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** являются образцы РНК, выделенные из клинических проб с использованием Комплекта реагентов для выделения РНК, входящего в состав варианта исполнения «Express».

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических 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.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

При использовании набора реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** комплектации «Express» для полного цикла исследования обработка клинического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки) для экспрессного выделения РНК, а также его хранение производится согласно данной инструкции (п.10.1-2).

При использовании набора реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2** комплектации «Base» для подготовки образцов РНК использовать набор реагентов для пробоподготовки с сорбентной очисткой нуклеиновых кислот «НК-сорбент» (РЗН 2019/9331). В случае использования набора «НК-сорбент» для выделения РНК необходимо при экстракции вместе с исследуемым образцом внести 5 мкл восстановленного ВКО (п.10.1) из набора реагентов **ПОЛИВИР SARS-CoV-2**. Анализ полученного препарата РНК проводить с п.10.3.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА²

10.1. Подготовка компонентов к проведению анализа, для всех вариантов исполнения.

Перед первым использованием набора необходимо восстановить образец ВКО!

10.1.1 Пробирку с лиофилизированным образцом ВКО (внутренним контрольным образцом) кратко центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для позиционирования содержимого на дне пробирки.

² Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru, на бумажном носителе предоставляется по запросу пользователя.

10.1.2. Добавить в нее 650 мкл Раствора для восстановления.

10.1.3. Растворять не менее 10 минут, периодически перемешивая на вортексе.

Приготовленный таким образом ВКО использовать в процедуре экстракции РНК. Хранить восстановленный ВКО при температуре +2...+8°C в течение 6-ти месяцев. Не замораживать!

10.2. Процедура выделения РНК, для варианта исполнения «Express».

10.2.1. Подготовка образцов к экстракции РНК с использованием Комплекта реагентов для выделения РНК.

10.2.1.1. Приготовить и промаркировать необходимое количество пробирок с Физиологическим раствором (в соответствии с количеством проб биоматериала плюс одну для отрицательного контроля выделения).

10.2.1.2. Поместить в подготовленную пробирку с физиологическим раствором рабочую часть зонда с ватным тампоном, вращать зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора.

10.2.1.3. Вынуть зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить зонд и закрыть пробирку. Зонд утилизировать в соответствии с утвержденными процедурами с использованием дезинфекционных средств на основе хлора.

10.2.1.4. В пробирку отрицательного контроля выделения внести 50 мкл очищенной воды (в комплект набора не входит).

Выделение РНК проводится из образцов в физиологическом растворе. Образцы использовать в течение 2-х часов для выделения РНК. Допускается хранение проб биологического материала в физиологическом растворе при -18...-25°C не более 2-х недель. Допускается однократное размораживание материала.

10.2.2. Выделение РНК с использованием Комплекта реагентов для выделения РНК.

10.2.2.1. Приготовить и промаркировать полипропиленовые пробирки с реактивом РНК-ЭКСПРЕСС, равное числу пробирок из п. 10.2.1.1.

10.2.2.2. Внести в подготовленные пробирки по 5 мкл ВКО.

10.2.2.3. Внести в подготовленные пробирки по 200 мкл:

- в пробирки для исследуемых образцов - исследуемые образцы (п. 10.2.1.3.);
- в пробирку ОКО – отрицательный контроль выделения (п. 10.2.1.4.);

10.2.2.4. Вортексировать пробирки в течение 10 секунд, скинуть капли коротким центрифугированием.

10.2.2.5. Установить пробирки в термостат и инкубировать 15 минут при 95°C.

10.2.2.6. Центрифугировать пробирки 1 минуту при 10 - 12 тыс.об./мин на центрифуге.

Полученный супернатант содержит РНК. Использовать супернатант для постановки ОТ-ПЦР в течение 20-30 минут.

Пробирку с выделенной РНК немедленно заморозить. Допускается хранение образцов при -18...-20°C не более 2-х недель.

10.3. Подготовка к проведению амплификации с обратной транскрипцией, для всех вариантов исполнения.

10.3.1. Подготовка к проведению ОТ-ПЦР образцов РНК, полученных с помощью Комплекта для выделения РНК комплектации «Express».

10.3.1.1. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью и разбавителем тщательно перемешать.

10.3.1.2. Приготовить и промаркировать одноразовую полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл или 2,0 мл для приготовления амплификационной смеси.

10.3.1.3. Из компонентов набора приготовить рабочую амплификационную смесь из расчета на 1 пробу:

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	17,5

Реакционная смесь	7,0
Смесь ферментов	3,5

После добавления Смеси ферментов, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием и осадить капли с крышки пробирки.

10.3.1.4. Приготовить бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации по количеству образцов, включая контрольные.

10.3.1.5. Внести в пробирки по 28 мкл приготовленной амплификационной смеси.

10.3.1.6. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы;
- в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец (ПКО);

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой. Перейти к пункту 10.4.

10.3.2. Подготовка к проведению ОТ-ПЦР образцов РНК, полученных с помощью наборов для выделения РНК с сорбентной очисткой.

10.3.2.1. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью, разбавителем и раствором ЭКС тщательно перемешать.

10.3.2.2. Приготовить и промаркировать одноразовую полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл или 2,0 мл для приготовления амплификационной смеси.

10.3.2.3. Из компонентов набора приготовить рабочую амплификационную смесь из расчета на 1 пробу:

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	17,5
Реакционная смесь	7,0
Смесь ферментов	3,5

После добавления Смеси ферментов, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием и осадить капли с крышки пробирки.

10.3.2.4. Приготовить бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации по количеству образцов, включая контрольные.

10.3.2.5. Внести в пробирки по 28 мкл приготовленной амплификационной смеси.

10.3.2.6. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме:

- в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – 3,5 мкл раствора ЭКС и 3,5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – 3,5 мкл раствора ЭКС и 3,5 мкл исследуемых образцов;
- в пробирку положительного контрольного образца – 7 мкл положительного контрольного образца (ПКО);

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой. Перейти к пункту 10.4.

10.4. Проведение амплификации.

10.4.1. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.4.2. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующей программе:

+42 °C	40 мин	
+95 °C	2 мин	
+95 °C	20 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+95 °C	20 сек	40 циклов
+64 °C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX, Cy5)	

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов ПОЛИВИР SARS-CoV-2, представлены в таблице 3 для амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» «CFX 96» (BioRad).

Таблица 3.

Параметр	Канал флуоресценции		
	FAM	HEX	Cy5
<i>Analyze Data from Cycle 5 to 40</i>			
<i>«Base»line Setting – Apply Fluorescence Drift Correction</i>			
<i>Base»line threshold</i>	100*	100*	20*

* - Внимание! Приведенные значения подходят к приборам данного типа в большинстве случаев. Однако для отдельных приборов или после перекалибровки шкала интенсивности может измениться. Для проверки адекватности следует выделить ячейки, где проводились тесты на присутствие интересующего индивидуального возбудителя, перейти в логарифмический режим отображения данных. В этих условиях правильному положению Threshold соответствует середина линейного участка подъема кривой.

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

11.2. Интерпретация результатов

Мишени, детектируемые по используемым каналам флуоресценции, представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Канал	Канал HEX	Канал FAM	Канал Cy5
Мишень	фрагмент генома Сарбековирюсов	фрагмент генома SARS-CoV-2	Внутренний контроль, искусственная РНК

Интерпретация результатов анализа с целью выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводится в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5.

	Ct FAM	Ct HEX	Ct Cy5	Результат
ПКО	< 25 по всем каналам			Реакция прошла
	НЗ или > 25 по любому из каналов			Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО	НЗ по всем каналам			Специфическая контаминация отсутствует.
	< 40 по любому из каналов		любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.
Анализируемый образец	< 35	< 35	любой	ПРИСУТСТВИЕ РНК SARS-CoV-2
	НЗ	< 35	< 30	Возможно присутствие РНК SARS-CoV-2, возможна мутация в гене SARS-CoV-2 на месте гибридизации олигонуклеотидов, входящих в состав набора, либо присутствие другого Сарбековирюса. Рекомендуется провести повтор анализа с использованием набора реагента другого производителя.
	Значение Ct определено, но > 35 по любому из каналов		< 30	Возможно присутствие РНК SARS-CoV-2. Рекомендуется провести повтор анализа данного образца, начиная с этапа выделения РНК. Выделение РНК следует проводить сорбентным методом, используя второй тупфер от пациента, либо аликвоту из пробирки с физиологическим раствором, оставшуюся в п. 10.2.1.3. Анализ с помощью ОТ-ПЦР следует проводить в трех повторностях. При повторной регистрации указанных значений Ct образец считается положительным
	НЗ	НЗ	< 30	ОТСУТСТВИЕ РНК SARS-CoV-2
	НЗ	НЗ	> 30	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца, начиная с этапа выделения РНК. Выделение РНК следует проводить сорбентным методом используя второй тупфер от пациента либо аликвоту из пробирки физиологическим раствором, оставшуюся в п. 10.2.1.3.

Внимание! В случае, если определено значение Ct по каналам FAM или HEX важно убедиться, что кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имеет характерную «S-образную» форму.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор реагентов ПОЛИВИП SARS-CoV-2 варианта исполнения «Base» должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев³.

Набор реагентов ПОЛИВИП SARS-CoV-2 варианта исполнения «Express» содержит комплекты, которые должны храниться при разном температурном режиме, при хранении набор необходимо разукруплять:

1) Комплект реагентов для выделения РНК должен храниться при температуре плюс 2-8 °С в течение всего срока годности. Срок годности комплекта – 6 месяцев.

2) Комплект реагентов ПОЛИВИП SARS-CoV-2 варианта исполнения «Base» должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплекта – 6 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов ПОЛИВИП SARS-CoV-2 транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Условия транспортирования набора и его комплектов должны соответствовать условиям хранения!

Допускается транспортировка набора реагентов во всех вариантах исполнения при температуре плюс 2-8 °С в течение трех суток.

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

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клиничко-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 1-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение РНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/ обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора ПОЛИВИП SARS-CoV-2, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственно-технического центра
ООО НПФ «Литех»



Т.В. Парфёнова

³ Данные не подтверждены исследованиями в реальном времени.

Информация получена с официального сайта

Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения

www.roszdravnadzor.ru



Исполнитель
Михайлов
М. М.