

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л. М. Халилова
«11» июля 2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для качественного выявления РНК
коронавируса (*SARS-CoV-2*) методом прямой
ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test-L»
по ТУ 21.20.23-062-97638376-2022**

Содержание

Список сокращений	3
Введение.....	4
1. Назначение.....	6
2. Принцип метода	6
3. Состав набора реагентов.....	8
4. Характеристики набора реагентов.....	10
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L».....	21
6. Меры предосторожности при работе с набором	22
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	25
8. Анализируемые образцы	26
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	29
10. Проведение анализа	30
11 Регистрация и интерпретация результатов	32
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора .	35
13. Утилизация	35
14. Гарантийные обязательства, контакты	37
Приложение А	38
Приложение Б.....	39

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ОТ	обратная транскрипция
кДНК	комплиментарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
ЛРС	лиофилизированная реакционная смесь
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ВКО	внутренний контрольный образец
КОС	контрольный образец специфичности
КОЧ	контрольный образец чувствительности

Введение

Целевой анализ: специфичные участки геномной РНК штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса, высококонсервативные фрагменты генов *N* и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности РНК/ДНК) в отношении генома штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae к линии Beta-CoV В. Вирус отнесен ко II группе патогенности, как и некоторые другие представители этого семейства (вирус SARS-CoV, MERS-CoV), и предположительно является рекомбинантным вирусом между коронавирусом летучих мышей и неизвестным по происхождению коронавирусом. Появление COVID-19 поставило перед специалистами здравоохранения задачи, связанные с быстрой диагностикой и оказанием медицинской помощи больным. В настоящее время продолжается интенсивное изучение клинических и эпидемиологических особенностей заболевания, разработка новых средств его профилактики и лечения. Наиболее распространенным клиническим проявлением нового варианта коронавирусной инфекции является двусторонняя пневмония (вирусное диффузное альвеолярное повреждение с микроангиопатией), у 3-4% пациентов зарегистрировано развитие острого респираторного дистресс- синдрома (ОРДС). У части больных развивается гиперкоагуляционный синдром с тромбозами и тромбоземболиями, поражаются также другие органы и системы (центральная нервная система, миокард, почки, печень, желудочно-кишечный тракт, эндокринная и иммунная системы), возможно развитие сепсиса и септического шока.¹

Раннее диагностирование тяжелой острой респираторной инфекции (атипичной пневмонии), вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, крайне актуально для правильной и своевременной постановки диагноза и назначения лечения.

¹ Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023)" (утв. Минздравом России)

Область применения набора реагентов: клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания к применению: выявление РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР рекомендуется к применению у пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам².

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор биоматериала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводится пациентам с клинической симптоматикой респираторного заболевания, с подозрением на инфицирование вирусом SARS-CoV-2, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам¹.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» предназначен для качественного выявления специфической части геномной РНК штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса – фрагментов генов *N* и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*), методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в клинических пробах (мазок из носоглотки, ротоглотки) с целью диагностики тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, у пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания, а также контактными лицам. Не требуется отдельного набора для выделения РНК, т.к. в состав набора входит ОТ-ПЦР-буфер, обеспечивающий лизис вирусных частиц и устойчивый к ингибиторам.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться для поддержки диагностики тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Результаты учитываются в комплексной диагностике заболевания.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник, лабораторный технолог.

2. Принцип метода

Метод

Одностадийная обратная транскрипция – мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией, не требующая процедуры выделения РНК (прямая ОТ-ПЦР-РВ)

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служит клинический материал больного, взятый из верхних дыхательных путей (мазок из носоглотки, ротоглотки).

ВНИМАНИЕ! Для повышения концентрации вируса

носоглоточные и орофарингеальные мазки должны быть помещены в одну пробирку.

Принцип определения

Выявление нуклеиновых частиц коронавируса SARS-CoV-2 основано на использовании метода реакции обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции в реальном времени в одной пробирке.

Лиофилизованная реакционная смесь (ЛРС-Cito) для ОТ-ПЦР готова к использованию и содержит ревертазу с «теплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дНТФ и оптимизированный буфер, позволяющий проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов, а также содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения РНК фрагментов генов *N* и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*) коронавируса SARS-CoV-2 и внутреннего контрольного образца (далее ВКО): продукты амплификации фрагментов генов *N* и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*) коронавируса SARS-CoV-2 регистрируются по одному каналу, соответствующему флуорофору FAM, продукты амплификации ВКО по HEX. (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM	HEX
SARS-CoV-2	ВКО

ВКО позволяет оценить корректность прохождения ОТ-ПЦР и степень ингибирования реакции.

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе проведения реакции ОТ-ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истекшим сроком годности или условий хранения набора.

Нарушение условий хранения и транспортирования образцов.

Время проведения реакции ОТ-ПЦР составляет от 80 до 100

минут в зависимости от используемой модели амплификатора (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Форма комплектации

Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» выпускается в одной форме комплектации.

Количество анализируемых проб

Каждый комплект реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» рассчитан на проведение 96 реакций ОТ-ПЦР, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательного и положительного контрольных образцов или 32 единичных постановок исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L»

№пп	Наименование реагента	Описание	Количество, объём
1.	ЛРС-Cito	Сухая аморфная пористая масса белого цвета	96 пробирок, объединенных «мостиками» в планшет, упакованный в штатив с крышкой (лиофилизат)
2.	Раствор для восстановления ЛРС-Cito	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1800 мкл
3.	ПКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета	1 флакон (лиофилизат)
4.	Раствор для восстановления ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 200 мкл
5.	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл

Лиофилизованная реакционная смесь (ЛРС-Cito) для ОТ-ПЦР содержит ревертазу с «теплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дНТФ и оптимизированный буфер, позволяющий проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов, смесь криопротекторов, а также содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд, специфичные фрагментам генов *N* и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*) коронавируса (SARS-CoV-2). Детекция осуществляется по каналу FAM.

2. Праймеры и зонд к внутреннему контрольному образцу. Детекция по каналу HEX.

В состав лиофилизованной реакционной смеси (ЛРС-Cito) для ОТ-ПЦР включен внутренний контрольный образец (ВКО), представляющий собой препарат НК.

Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой лиофилизованную смесь плазмидного вектора с синтетическими вставками ДНК, комплементарными РНК внутреннего контрольного образца и фрагментов генов *N* и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*) коронавируса (SARS-CoV-2), а также криопротекторов.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от РНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 - Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test-L»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1) Внешний вид	
ЛРС-Cito	Сухая аморфная пористая масса белого цвета
Раствор для восстановления ЛРС-Cito	Прозрачная бесцветная жидкость
ПКО	Сухая аморфная пористая масса белого цвета
Раствор для восстановления ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с пунктом 1.4 ТУ 21.20.23-062-97638376-2022
1.3. Маркировка	В соответствии с пунктом 4 ТУ 21.20.23-062-97638376-2022
1.4. Упаковка	В соответствии с пунктом 5 ТУ 21.20.23-062-97638376-2022
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналу FAM Ct \leq 30 и по каналу HEX Ct \leq 32.
Отрицательный результат ОКО	В пробирках с ОКО по каналу FAM Ct >40 или не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), по каналу HEX Ct \leq 32
Прохождение реакции с СОП-КОС	В пробирках с СОП-КОС по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), по каналу HEX Ct \leq 32
Прохождение реакции с СОП-КОЧ-1	В пробирках с СОП-КОЧ-1 по каналам FAM и HEX во всех повторностях (не менее 3) Ct \leq 38 и при значении стандартного отклонения в повторах СОП-КОЧ-1 не более 3%
Прохождение реакции с СОП-КОЧ-2	В пробирках с СОП-КОЧ-2 по каналам FAM и HEX во всех повторностях (не менее 3) Ct \leq 38 и при значении стандартного отклонения в повторах СОП-КОЧ-2 не более 3%

Примечание: при проведении контрольной ПЦР в качестве СОП-КОЧ-1, СОП-КОЧ-2 и СОП-КОС используют:

- в качестве контрольного образца для определения чувствительности СОП-КОЧ-1 используют смесь плазмид с синтетическими вставками последовательностей, комплементарных мишеням фрагмента гена N коронавируса (SARS-CoV-2) с концентрацией 500 копий/мл и фрагменту, комплементарного РНК внутреннего контрольного образца с концентрацией 100 000 копий в мл в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА);

- в качестве контрольного образца для определения чувствительности СОП-КОЧ-2 используют смесь плазмид с синтетическими вставками последовательностей, комплементарных мишеням фрагмента гена RdRp (open reading frame 1ab, ORF1ab) коронавируса (SARS-CoV-2) с концентрацией 500 копий/мл и фрагменту, комплементарного РНК внутреннего контрольного образца с концентрацией 100 000 копий в мл в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА);

- в качестве контрольного образца специфичности (СОП-КОС) используют раствор геномной ДНК человека, выделенный из клеточной линии U-937 с концентрацией 1 000 копий на 20 мкл (167 000 копий/мл).

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14).

4.1 Характеристики аналитической эффективности

4.1.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к фрагментам гена N и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*) SARS-CoV-2 коронавируса.

4.1.1.1 Подтверждение специфичности *in silico*

Аналитическая специфичность целевых фрагментов генов N и *RdRp* (open reading frame 1ab, *ORF1ab*) SARS-CoV-2, подтверждалась *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.1.1.2 Подтверждение специфичности *in vitro* с помощью сертифицированных контрольных материалов

Для оценки возможности обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 использовали стандартный образец NIBSC:

- Международный стандарт ВОЗ Первый Международный

стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/146.

Международный стандарт ВОЗ после восстановления был протестирован в двух дублях в каждом цикле анализа.

С помощью серии ПЦР-реакций проводили исследование Международного стандарта с помощью набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L». По результатам исследования Международного стандарта ВОЗ:

- «Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2», код NIBSC: 20/146, подтверждена специфичность набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» по отношению к РНК штамма SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) коронавируса.

4.1.1.3 Аналитическая специфичность: оценка кросс-реактивности

Исследования по аналитической специфичности: оценки кросс-реактивности проводились при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов/штаммов:

– штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США):

Streptococcus pneumoniae (ATCC® 49619™),

Pseudomonas aeruginosa (ATCC® 9027™),

Mycoplasma pneumoniae, Strain PI 1428 (ATCC® 29085™),

Chlamydomonas pneumoniae, Strain CM-1 (ATCC® VR-1360™),

Legionella pneumophila subsp. pneumophila, Strain Philadelphia 1 (ATCC® 33152™),

Staphylococcus epidermidis, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™),

Human Respiratory Syncytial Virus, Strain 9320 (ATCC® VR-955™),

Human Respiratory Syncytial Virus, Strain A-2 (ATCC® VR-1540™),

Human Parainfluenza Virus 1, Strain C35 (ATCC® VR-94™),
Human Parainfluenza Virus 2, Strain Greer (ATCC® VR-92™), Human
Parainfluenza Virus 3, Strain C243 (ATCC® VR-93™), Human
Rhinovirus 17, Strain 33342 (ATCC® VR-1663™), Human Adenovirus
1, Strain Adenoid 71 (ATCC® VR-1™), Human Coronavirus, Strain
OC43 (ATCC® VR-1558™), Human Coronavirus, Strain 229E

(ATCC® VR-740™),

в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;

– штаммы из коллекции ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов):

Haemophilus influenzae 423,

Streptococcus pyogenes Dick – I,

Bordetella pertussis 703 L 6,

в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;

– штаммы из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А.

Сморозинцева»:

А/Санкт-Петербург/НИИГ-252/19 (Influenza virus A (H3N2)),

А/Калининград/75/19 (Influenza virus A (H1N1)pdm09),

В/Washington/02/19 (Influenza virus В линия Виктория),

В/Якутск/НИИГ-06/2019 (Influenza virus В линия Ямагата) в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^7 ГЭ/мл.

Очищенная ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов была исследована с помощью набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L». По результатам исследования неспецифических реакций выявлено не было.

4.1.2 Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ (таблица 5), которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца биологическим агентом (муцин, гемоглобин) может ингибировать ПЦР.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Анализ результатов проведенного исследования.

Тип	Вещество	Активный компонент	Концентрация
Эндогенные	Биологические агенты	Муцин	2% мас/об
		гемоглобин	0,01% об/об
Экзогенные	Безрецептурные капли для носа	Фенилэфрин	15% об/об
	Безрецептурный гель для носа	Хлорид натрия	5% об/об
	Безрецептурный спрей для носа1	Кромолин	15% об/об
	Безрецептурный спрей для носа2	Оксиметазолин	15% об/об
	Безрецептурный спрей для носа3	Флуконазол	5% мас/об
	Леденец от боли в горле	Бензокаин, Ментол	0,15% мас/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа1	Гальфимия глаука, Сабадилла	20% об/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа2	Глюконат цинка	5% мас/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа3	Алкалол	10% об/об
	Безрецептурный гомеопатический спрей для носа4	Флутиказона пропионат	5% об/об
	Спрей от боли в горле с фенолом	Фенол	15% об/об
	Противовирусный лекарственный препарат	Тамифлю (фосфат осельтамивира)	0,5% об/об
	Антибиотик, мазь для носа	Мупироцин	0,25% об/об
	Антибактериальное, системное	Тобрамицин	0,0004% мас/об

На основании результатов исследования данные вещества не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);
- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

4.1.3 Аналитическая чувствительность: предел обнаружения (LOD)

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций **CLSI EP-17A2** предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений Международных стандартов ВОЗ:

- Международный стандарт ВОЗ Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/146

в диапазоне предполагаемого предела обнаружения в объеме 1 мл исследуемого биообразца: 200 копий/мл, 250 копий/мл, 300 копий/мл, 350 копий/мл, 400 копий/мл, 450 копий/мл, 500 копий/мл.

Каждое из 7 разведений анализировали с помощью набора «Cito-CoV-2-Test-L» в течение 3 разных дней в 30 повторах для расчета процента положительных результатов. Результаты определялись в соответствии с международными рекомендациями **CLSI EP-17A2** пробит-анализом.

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «Cito-CoV-2-Test» были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США);
- Амплификатор FLUORITE (Xian TianLong Science and Technology Co, Китай).

В соответствии с рекомендациями документа **CLSI EP-17A2** с использованием пробит-анализа проводилась статистическая обработка полученных результатов. Для расчета предельной

концентрации РНК коронавируса SARS-CoV-2 с доверительной вероятностью 95% использовалось пробит-значение (ось Y) 6,64(1,64 для предела 95 %, +5 для пробит-шкалы).

По результатам исследования предел обнаружения РНК SARS-CoV-2 в биообразцах объемом 1 мл с частотой выявления 95 % для амплификатора ДТпрайм – 440 копий/мл (95%ДИ: 386,32-493,68), CFX 96 – 479 копий/мл (95%ДИ: 425,32-532,68), Quant Studio 5 – 464 копий/мл (95%ДИ: 410,32-517,68), FLUORITE – 448 копий/мл (95%ДИ: 394,32-501,68).

4.1.4 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, внутренний контрольный образец по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%.

4.1.5 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости (раздел 4.2.3.), однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 3%.

4.1.6 Метрологическая прослеживаемость калибровки и приписанное значение калибраторов конечного пользователя – ПКО, входящего в состав набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L», и рабочих калибраторов СОП-КОЧ-1, СОП-КОЧ-2, СОП-КОС в

соответствии с ГОСТ Р ИСО 17511— 2022.

Иерархия калибровки ПКО, СОП-КОЧ-1, СОП-КОЧ-2 проведена с международным общепринятым калибратором, определяющим измеряемую величину (п. 5.5 ГОСТ Р ИСО 17511— 2022):

- Международный стандарт ВОЗ Первый Международный стандарт ВОЗ для проведения анализов на РНК коронавируса SARS-CoV-2, код NIBSC: 20/146,

Общая иерархия калибровки с указанием неопределенности измерений на каждом этапе представлена в таблице 4.

Таблица 4

Аналит	Образец	Тип образца	Неопределенность измерений	Клинический материал			
				Мазок из носоглотки		Мазок из ротоглотки	
				Суммарная стандартная неопределенность	Расширенная суммарная неопределенность	Суммарная стандартная неопределенность	Расширенная суммарная неопределенность
РНК SARS-CoV-2	Международный общепринятый калибратор РНК SARS-CoV-2 (из Коллекции NIBSC: 20/146)	Международный общепринятый калибратор	$u_{m.3} = 0,32$	$u(y) = 0,47$	$U(y) = 0,94$	$u(y) = 0,46$	$U(y) = 0,92$
	СОП-КОЧ-1, СОП-КОЧ-2	Рабочий калибратор	$u_{p.4} = 0,07$				
	ПКО	Калибратор МИ IVD конечного пользователя	$u_{p.5} = 0,06$ $u_{cal} = 0,33$				

Приписанная концентрация калибратора конечного пользователя **ПКО** составляет 1×10^5 копий/мл, рабочих калибраторов **СОП-КОЧ-1, СОП-КОЧ-2** составляет 500 копий/мл.

В соответствии с п. 4.7.1 с) ГОСТ Р ИСО 17511— 2022 суммарная стандартная неопределенность измерения значения, присвоенного калибратором МИ IVD конечного пользователя (ПКО) u_{cal} не превышает допустимую долю $U_{max}(y)$ спецификации для МИ IVD с учетом коэффициента охвата k ($k = 2$, для уровня достоверности приблизительно 95 %):

$$u_{cal} = 0,94 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1 - \text{по отношению к РНК SARS-CoV-2 для мазков из носоглотки}$$

$$u_{cal} = 0,92 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1 - \text{по отношению к РНК SARS-CoV-2 для мазков из ротоглотки}$$

И в соответствии с п. 4.1 с) ГОСТ Р ИСО 17511— 2022 оцененная суммарная расширенная неопределенность измерений $U(y)$ не превышает максимально допустимую неопределенность измерения $U_{max}(y)$:

$$U(y)=0,94 \leq U_{max}(y)=2 \text{ – по отношению к РНК SARS-CoV-2}$$

для мазков из носоглотки

$$U(y)=0,92 \leq U_{max}(y)=2 \text{ – по отношению к РНК SARS-CoV-2}$$

для мазков из ротоглотки

Иерархия калибровки СОП-КОС проведена с первичной РМИзм, определяющей измеряемую величину (п. 5.3 ГОСТ Р ИСО 17511— 2022).

Общая иерархия калибровки с указанием неопределенности измерений на каждом этапе представлена в таблице 5.

Таблица 5

Аналит	Образец	Тип образца	Неопределенность измерений	Суммарная стандартная неопределенность	Расширенная суммарная неопределенность
геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U937	Вторичный СО - геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U937 (производства ООО “СибЭнзайм”, Россия)	Вторичный СО	$u_{m.3} = 0,78$	$u(y) = 0,78$	$U(y) = 1,56$
	СОП-КОС	Рабочий калибратор	$u_{p.4} = 0,1$		

Приписанная концентрация рабочего калибратора СОП-КОС составляет 1 000 копий на 20 мкл (167 000 копий/мл).

4.2 Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использовано 93 образца клинического материала, взятого из верхних дыхательных путей (мазок из носоглотки, ротоглотки), от пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного из пула образцов, поступающих на тестирование в ФГБОУ ВО Сам ГМУ Минздрава России.

Такое количество образцов было набрано в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом рекомендаций Международного руководства CLSI EP09-A3.

Каждый исследуемый клинический образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» и полученные данные сравнивались с результатами, полученными ФГБОУ ВО Сам ГМУ Минздрава России **с помощью зарегистрированного медицинского изделия** «Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (*SARS-CoV-2*) методом прямой ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test», производства ООО «ТестГен», Россия, регистрационное удостоверение № РЗН 2022/17319 от 24.05.2022.

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия было совпадение результатов.

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» использовали амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),
- ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011),
- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),
- FLUORITE (Xian TianLong Science and Technology Co, Китай, РУ №РЗН 2022/16415 от 04.04.2024).

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик были рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934).

The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986).

Диагностические характеристики испытуемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
мазок из носоглотки, ротоглотки	96	90	100% (95% ДИ:96,23%-100%)	100% (95% ДИ:95,98%-100%)

Для оценки перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» были исследованы также **35 образцов** мазков из носоглотки и ротоглотки, не содержащих РНК коронавируса SARS-CoV-2, но с подтвержденным положительным наличием геномной НК следующих организмов и вирусов: *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus epidermidis*, Human Respiratory Syncytial Virus, Human Parainfluenza Virus 1, Human Parainfluenza Virus 2, Human Parainfluenza Virus 3, Human Rhinovirus, Human Adenovirus 1, Human Coronavirus, Strain OC43, Human Coronavirus, Strain 229E, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, Influenza virus A (H3N2), Influenza virus A (H1N1)pdm09, Influenza virus B линия Виктория, Influenza virus B линия Ямагата. По результатам исследования перекрестной реактивности не наблюдалось.

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,
2. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемого образца содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР,
3. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации (невыполнение требований по предварительной инаktivации клинического материала);
4. использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (SARS-CoV-2) методом прямой ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test-L»» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3 – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

ВНИМАНИЕ! Клинический материал необходимо предварительно инактивировать путём прогревания при 70 °С в течение 5 минут в рабочей зоне ¹.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «Cito-CoV-2-Test-L», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Cito-CoV-2-Test-L», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

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 настоящих методических рекомендаций.

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и

² Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023) " (утв. Минздравом России)

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 СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". 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).

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность коронавирусом SARS-CoV-2, проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) (СанПиН 3.3686-21), временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV), а также Информационного письма Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) от 21.01.2020 № 02/706-2020-27 "О направлении временных рекомендаций по организации лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб, помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным

объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиНом 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»;

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

2. не использовать набор по истечении срока годности;

3. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с комплектом реагентов для ОТ-ПЦР «Cito-CoV-2-Test-L» осуществляется в рабочей зоне 2 (для выделения НК) (МУ 1.3.2569- 09).

Оборудование для проведения реакции ОТ-ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, Боксы микробиологической безопасности БМБ-II- "Ламинар-С" по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020, производства ЗАО "Ламинарные системы", РУ № ФСР 2012/13259 от 29.07.2021 или Бокс для стерильных работ DNA/RNA UV-Cleaner Box UVC/T-M-AR, Biosan, Латвия, РУ № РЗН 2023/19369 от 18.01.2023);

2. Вортекс (например, Высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12, BIOSAN SIA, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/10116 от 11.07.2011 или центрифуга-встряхиватель CM-70M, производства SIA "ELMI", Латвия, РУ № РЗН 2016/4616 от 31.05.2023);

3. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5–10 мкл, 10–100 мкл или 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, Eppendorf Research Plus, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011 или «Biohit», Финляндия, РУ № ФСЗ 2012/12201 от 18.05.2012);

4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С (например, Холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-250 "POZIS", ХЛ-250-1 "POZIS" по ТУ 9452-203-07503307-2012, производства АО "ПОЗИС", РУ № РЗН 2016/4043 от 08.05.2019);

5. Амплификатор³ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow:

- CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),

- ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011),

- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),

³ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

- FLUORITE (Xian TianLong Science and Technology Co, Китай, РУ № РЗН 2022/16415 от 04.04.2024).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/12077 от 27.02.2014).

2. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.

3. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

4. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,1 или 0,2 мл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014).

5. Для взятия мазка из носоглотки и ротоглотки рекомендуется использовать «Зонд медицинский одноразовый стерильный по ТУ 32.50.13-002-28731857-2020», производства ООО «ФармМедПолисРТ», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/13989 от 09.12.2022).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служит клинический материал больного, взятый из верхних дыхательных путей (мазок из носоглотки, ротоглотки).

ВНИМАНИЕ! В качестве пробирок с транспортной средой использовать ТОЛЬКО стерильные пробирки типа Эппендорф на 1,5-2,0 мл, содержащие 500 мкл стерильного физиологического раствора (или Фосфатного буферного (PBS) раствора). Использование транспортных сред с другим составом может привести к получению невалидного результата вследствие ингибирования реакции.

ВНИМАНИЕ! Использование центрифужных пробирок объёмом 5-15 мл может привести к ложноположительным результатам вследствие контаминации при переносе клинического материала в пробирку для ОТ-ПЦР. При невозможности отказа от центрифужных пробирок объёмом 5-15 мл рекомендуется предварительно перенести биоматериал в пробирку типа Эппендорф на 1,5-2,0 мл с использованием длинных наконечников на 1000 мкл,

в дальнейшем вносить биоматериал в ОТ-ПЦР наконечником на 10-20 мкл из пробирки типа Эппендорф на 1,5-2,0 мл.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

8.1 Процедура получения биологического материала

ВНИМАНИЕ! Забор диагностического материала, его упаковка, маркировка и транспортировка осуществляется в соответствии с требованиями и правилами к работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранении и транспортировке согласно МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности" и Методическими рекомендациями Роспотребнадзора МР 3.1.0169-20 "Лабораторная диагностика COVID-19".

Медицинский работник, выполняющий забор диагностического материала, его маркировку и упаковку, должен пройти инструктаж по санитарно-эпидемиологическим требованиям и правилам биологической безопасности при работе с пациентами, потенциально инфицированными микроорганизмами II группы патогенности.

Забор материала на исследование

Мазок с носоглотки

Мазок из полости носа берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

Мазок из ротоглотки

Мазки берут сухими ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку типа Эппендорф с 500 мкл стерильного физиологического раствора или (или Фосфатного буферного (PBS) раствора) и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом внутри.

Пробирку плотно закрывают крышкой.

ВНИМАНИЕ! Для повышения концентрации вируса носоглоточные и орофарингеальные мазки должны быть помещены в одну пробирку.

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

Температура при транспортировке должна быть 2-8°C. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 5 дней при 2- 8°C, может быть больше при -20°C или -70°C.

Транспортировка герметично закрытых контейнеров с образцами в лабораторию осуществляется в специальных контейнерах/биксах. Направления и другая документация на бумажных носителях передается в отдельном полиэтиленовом пакете.

При необходимости пересылки образцов в лабораторию другого медицинского учреждения выполняются требования к пересылке инфекционных материалов II группы патогенности (СП 1.2.036-95 "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности").

Пробирки/контейнеры с образцами вместе с крышкой герметизируют различными пластификаторами (парафин, парафильм и др.); емкость маркируют. Образцы каждого пациента помещают в индивидуальный герметичный пакет с адсорбирующим материалом и дополнительно упаковывают в общий герметичный пакет. Два или более образца одного пациента могут быть упакованы в один пластиковый пакет. Запрещается упаковывать образцы клинического материала от разных людей в одну упаковку.

Пакет с контейнерами помещают в герметично закрывающийся контейнер для транспортировки биологических материалов. Контейнер помещают в пенопластовый термоконтейнер с охлаждающими термоэлементами. Транспортный контейнер печатывается и маркируется. В контейнер желательно поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение температуры от 2° С до 8°C. Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочноприкрепляются снаружи контейнера.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Клинический материал необходимо предварительно инактивировать путём прогревания при 70°C в течение 5 минут в рабочей зоне ¹⁴.

ВНИМАНИЕ! Лиофилизованную реакционную смесь (ЛРС-Cito) для ОТ-ПЦР следует восстанавливать непосредственно перед проведением анализа.

Подготовка компонентов набора для ОТ-ПЦР

Перед началом работы необходимо выдержать компоненты набора при температуре 18-25°C в течение 30 минут.

Вскрыть флакон с ПКО и добавить 200 мкл раствора для восстановления ПКО. Плотно закрыть флакон. Аккуратно перемешать, выдержать при температуре от 18°C до 25°C в течение 15 минут, после чего вновь перемешать. После разведения хранить при температуре от -18°C до -22°C в течение 1 года или при температуре от 2°C до 8°C в течение 1 месяца.

Вскрыть упаковку с ЛРС-Cito, с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество пробирок с ЛРС-Cito (включая контрольные образцы). Отрезать пробирки следует с покрывающей их пленкой. Неиспользованные пробирки с ЛРС-Cito необходимо хранить в упаковке в течение срока годности набора.

¹⁴ Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023) " (утв. Минздравом России)

10. Проведение анализа

Исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ОТ-ПЦР;
2. Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

1. Подготовка ОТ-ПЦР

Для проведения одной реакции необходимо:

1. Раствор для восстановления ЛРС-Cito – 20 мкл.
2. Образец (исследуемый образец) – 5 мкл
3. Образец ПКО и ОКО – 5 мкл.

Общий объём реакции – 25 мкл (с учетом объема лиофильной смеси).

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 7 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки в соответствии с протоколом (с учетом ПКО и ОКО).
2. Внести в соответствующие пробирки раствор для восстановления ЛРС-Cito в соответствии с таблицей 7.
3. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл образца. В пробирки для ПКО и ОКО образец не вносится.
4. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО.
5. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО.
6. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.
7. Выдержать пробирки в течение 3-5 минут для восстановления реакционной смеси при комнатной температуре.

Таблица 7 – Пример расположения пробирок и внесения компонентов для проведения ПЦР

Компонент	Образец 1		Образец 2		Контроли	
	повторы ¹		повторы ¹		ПКО	ОКО
Раствор для восстановления ЛРС-Cito, мкл	20	20	20	20	20	20
Образец, мкл	5	5	5	5	-	-
ПКО, мкл	-	-	-	-	5	-
ОКО, мкл	-	-	-	-	-	5

Примечание: для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах

Б) Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация РНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ОТ-ПЦР указан в таблице 8.

Таблица 8 – Протокол ОТ-ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин.:сек.	Каналы детекции	Всего циклов
1	52	25:00	□	□
2	95	02:00	□	□
3	95	00:15	□	5
	64	00:20		
4	95	00:15	□	45
	64	00:20		
			FAM/Green, HEX/Yellow	

10. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

11. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы

детекции FAM/Green и HEX/Yellow.

12. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

13. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11 Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят автоматически по завершению ОТ-ПЦР с помощью программного обеспечения используемого прибора. Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct ВКО (канал HEX) и Ct мишеням коронавируса (канал FAM).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения Ct в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (таблица 9).

Таблица 9 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Канал детекции	
	FAM (коронавирус)	HEX (ВКО)
ОКО	Ct >40 или отсутствует	Ct ≤32
ПКО	Ct ≤30	Ct ≤32

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принцип интерпретации результатов отражён в таблице 10 и выполняется в следующем порядке:

1. Определяют качество проведённого анализа по значению C_t для канала HEX, которое должно составлять не более 32.
2. Оценивают результат реакции по каналу FAM.

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов.

Значение порогового цикла (C_t) по каналам		Результат
FAM	HEX	
Отсутствует	$C_t \leq 32$	РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена
$C_t \leq 38$	не учитывается ⁵	РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена
$C_t > 38$ или отсутствует	$C_t > 32$ или отсутствует	Результат невалидный
$C_t > 38$	$C_t \leq 32$	Результат сомнительный

Принцип интерпретации результатов:

РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена «-», если C_t по каналу HEX не более 32, а по каналу FAM C_t не указан (график накопления флуоресценции отсутствует).

РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена «+», если C_t по каналу FAM не более 38. Результат по каналу HEX при этом не учитывается.

Результат анализа невалидный если C_t по каналу FAM не указан (график накопления флуоресценции отсутствует) или более 38, и C_t по каналу HEX не указан (график накопления флуоресценции отсутствует) или более 32.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация РНК, высокая концентрация ингибиторов в клиническом образце; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ОТ-

⁵ При высоких концентрациях РНК коронавируса SARS-CoV-2 выход по каналу HEX может происходить на поздних циклах или отсутствовать.

ПЦР и др.

Результат анализа сомнительный, если Ct по каналу FAM более 38, а Ct по каналу HEX не более 32.

В случае невалидного и сомнительного результата заключения не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата образец считать положительным.

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом), с учетом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, с целью диагностики тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, у пациентов с клинической симптоматикой респираторного заболевания, а также контактными лицам.

Результаты, полученные при использовании набора, должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами, применяемой терапией.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2°C до 25°C в течение всего срока годности набора. Заморозка невосстановленной лиофильной смеси не допускается. Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Набор реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» транспортировать при температуре от 2°C до 25 °C в течение всего срока годности набора. При транспортировке исключить встряхивание набора для предотвращения разрушения лиофильной смеси.

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

Срок годности набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

- после вскрытия заводской герметичной упаковки срок годности пробирок с раствором для восстановления ЛРС-Cito и ОКО при температуре от 2°C до 8°C - 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации;

- ПКО после восстановления хранить при температуре от минус 18 до минус 22°C в течение 1 года или при температуре от 2°C до 8°C в течение 1 месяца;

- пробирки с лиофилизированной смесью ЛРС-Cito предназначены для однократного применения. ЛРС-Cito хранить в закрытой заводской герметичной упаковке при температуре от 2°C до 25°C в течение всего срока годности набора. ЛРС-Cito следует восстанавливать непосредственно перед проведением анализа.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации 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».

Используемая потребительская упаковка и пробирки с реагентами не связаны с биологическими жидкостями человека и в соответствии с классификацией медицинских отходов относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с ч. X, п. 170 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» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Cito-CoV-2-Test-L» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Символы маркировки

Символ	Расшифровка
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Обратитесь к инструкции по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Код партии
	Использовать до...
	Дата изготовления
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Пиктограмма «Верх» показывает правильное положение груза в пространстве. Стрелки указывают на верхнюю часть содержимого. Транспортную упаковку с этим символом нельзя переворачивать или сваливать на бок. Ее нужно хранить и перевозить исключительно вертикально.

Приложение Б

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i> .
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023	Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования.
ГОСТ Р ИСО 17511-2022	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, приписанных калибраторам, контрольным материалам правильности и образцам биологического материала человека