

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор ФБУН НИИ эпидемиологии  
и микробиологии имени Пастера



А.А. Тотолян  
«26» мая 2020 г.

## **ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению Набора реагентов для выявления  
РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале  
методом полимеразной цепной реакции  
в реальном времени (COVID-2019 Amp)**

COVID-19-AMP.RU

## Содержание

<b>1. Назначение</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Риски применения</b> .....	<b>6</b>
2.1. Потенциальный риск применения .....	6
2.2. Прямой риск применения .....	6
2.3. Косвенный риск применения .....	6
<b>3. Характеристика изделия</b> .....	<b>7</b>
3.1. Принцип качественного метода исследования и порядок выполнения тестирования .....	7
3.2. Состав МИ .....	8
<b>4. Меры предосторожности</b> .....	<b>9</b>
<b>5. Требуемое дополнительное оборудование и материалы</b> .....	<b>11</b>
<b>6. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Проведение исследования</b> .....	<b>12</b>
7.1. Меры предосторожности .....	12
7.2. Требования к персоналу .....	13
7.3. Экстракция ДНК/РНК из клинического материала .....	13
7.4. Подготовка образцов и постановка ПЦР .....	14
7.5. Регистрация результатов .....	15
7.6. Анализ и интерпретация результатов .....	16
7.7. Аналитические характеристики .....	17
7.8. Предупреждения .....	18
<b>8. Условия транспортирования и хранения</b> .....	<b>18</b>
<b>9. Указания по утилизации</b> .....	<b>19</b>

Настоящая инструкция содержит информацию, необходимую для правильного и безопасного применения медицинского изделия (МИ) для *in vitro* диагностики Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (COVID-2019 Amp), разработанного и произведенного Федеральным бюджетным учреждением науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

## **1. Назначение**

**1.1.** Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (COVID-2019 Amp) предназначен для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

**1.2.** По своему функциональному назначению МИ является диагностическим средством, служащим для этиологического подтверждения коронавирусной инфекции COVID-19, используемым в клинической лабораторной диагностике. Кроме того, МИ может быть использовано для осуществления эпидемиологического надзора за коронавирусной инфекцией COVID-2019.

### **1.3. Тип анализируемого образца**

В соответствии с Временными методическими рекомендациями Минздрава РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, утвержденными 02.03.2020, в качестве основного вида клинического материала для лабораторного исследования используется мазок из носа и/или зева.

### **1.4. Потенциальные потребители**

Потенциальными потребителями МИ являются специалисты учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (центры гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, противочумные учреждения, научные организации, санитарно-эпидемиологические службы министерств и ведомств), а также специалисты медицинских учреждений, имеющие специальность врача клинической лабораторной диагностики или биолога согласно требованиям Приказа Минздравсоцразвития № 541н от 23.07.2010 г. и Приказа Минздрава № 707н от 8.10.2015 г.

К работе с МИ допускаются только специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)»).

#### **1.5. Целевой анализ**

Целевым анализом для проведения качественной ОТ-ПЦР являются молекулы РНК, экстрагированные из исследуемого клинического материала, содержащие последовательности нуклеотидов, специфичные для РНК коронавируса вида SARS-CoV-2.

#### **1.6. Специфическая патология**

Для коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, характерно наличие клинических симптомов острой респираторной вирусной инфекции, в том числе повышение температуры тела (>90% случаев), кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты) в 80% случаев, одышка (55% случаев), миалгии и утомляемость (44% случаев), ощущение заложенности в грудной клетке (>20% случаев). Также среди первых симптомов в отдельных случаях отмечаются головные боли (8% случаев), кровохарканье (5% случаев), диарея (3% случаев), тошнота, рвота, сердцебиение. Инфекция, вызванная коронавирусом вида SARS-CoV-2, может проявляться в виде острого респираторного заболевания легкого течения, пневмонии, как без дыхательной недостаточности, так и с развитием острой дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического (инфекционно-токсического) шока. У пожилых людей, а также у лиц с имеющимися соматическими заболеваниями, например, артериальной гипертензией, заболеваниями сердца или диабетом, вероятность тяжелого течения заболевания выше. В 3% случаев заболевание заканчивается летальным исходом.

#### **1.7. Предназначение МИ для клинической лабораторной диагностики**

В соответствии с Временными методическими рекомендациями Минздрава РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, от 02.03.2020 исследование проводится при наличии клинической симптоматики респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную коронавирусом SARS-CoV-2, в особенности у пациентов, прибывающих из эпидемиологически неблагополучных регионов, а также у контактных лиц.

Диагностику инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР рекомендовано проводить (в соответствии с рекомендациями ВОЗ «Глобальный эпиднадзор за случаями инфекции человека, вызванной коронавирусом (SARS-CoV-2)») во всех случаях, подозрительных на инфекцию.

Для более полной характеристики циркуляции вируса при наличии соответствующих ресурсов могут проводиться исследования большего охвата (например, дозорный эпиднадзор).

Опираясь на клиническое суждение, клиницист может назначить лабораторное исследование в случаях, не строго удовлетворяющих критериям назначения исследования, например, при возникновении групповой вспышки острого респираторного заболевания среди медицинских работников.

## **2. Риски применения**

Все компоненты МИ в используемых концентрациях являются нетоксичными, поэтому при использовании по целевому назначению МИ безопасно и не обладает токсичностью.

Риски возникновения опасных последствий применения МИ COVID-2019 Амр при его использовании определены согласно требованиям ГОСТ Р 51088-2013.

### **2.1. Потенциальный риск применения**

По степени потенциального риска применения МИ COVID-2019 Амр относится к классу 3 (п. 9.3. Приказа МЗ РФ № 4н от 06.06.2012 г. Раздел II. Классификация медицинских изделий для диагностики *in vitro* и п. 5.2.2. ГОСТ Р 51088.

### **2.2. Прямой риск применения**

При использовании МИ требуется соблюдение мер биологической безопасности и асептической техники взятия биологических образцов. Следует исходить из предположения, что все собранные для анализа с помощью МИ COVID-2019 Амр образцы представляют собой потенциально инфекционный материал, обращаться с которым следует, соблюдая технику безопасности согласно ГОСТ Р 52905-2007.

### **2.3. Косвенный риск применения**

Косвенный риск применения МИ COVID-2019 Амр связан с вероятностью получения как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов, что может привести к ошибочному медицинскому решению и отрицательно повлиять на тактику терапевтических и противоэпидемических мероприятий.

Причинами ложноотрицательных результатов могут быть:

- 1) порча отдельных компонентов МИ в результате несоблюдения условий его транспортирования и хранения до использования;
- 2) превышение гарантийных сроков хранения, указанных на этикетках;
- 3) несоблюдение требований инструкции по применению в ходе обработки образцов.

Причинами ложноположительных результатов могут быть:

- 1) контаминация реагентов посторонними микроорганизмами в результате нарушения целостности упаковки;
- 2) длительная контаминация лабораторных помещений, оборудования, расходных материалов в результате проведения работ персоналом, не обладающим достаточной квалификацией;
- 3) несоблюдение указаний об опасностях повторного применения расходных материалов, предназначенных для однократного применения.

### **3. Характеристика МИ**

#### **3.1. Принцип качественного метода исследования и порядок выполнения тестирования**

Анализ образцов включает этапы обратной транскрипции РНК, экстрагированной из образцов исследуемого клинического материала, амплификации специфических фрагментов кДНК коронавируса SARS-CoV-2 в ходе ПЦР и детекции продуктов амплификации в режиме реального времени.

Экстракция РНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Отдельно используется положительный контрольный образец (ПКО) для контроля обратной транскрипции РНК, положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контрольный образец для контроля обратной транскрипции РНК (ОКО) и отрицательный контроль ПЦР (К-).

Реакция обратной транскрипции проводится с целью образования комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК. Принцип качественного метода заключается в синтезе кДНК на матрице РНК коронавируса SARS-CoV-2 и выявлении специфического фрагмента кДНК коронавируса SARS-CoV-2 непосредственно по мере накопления продукта амплификации в ходе ПЦР путем детекции флуоресценции, испускаемой флуоресцентно-меченым гидролизным зондом. Начало флуоресценции и ее интенсивность количественно зависят от концентрации детектируемого фрагмента кДНК в образце. Также в реакции обратной транскрипции происходит образование кДНК внутреннего контрольного образца (ВКО) для использования в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с целью контроля качества выделения РНК.

Основой для возникновения флуоресценции является амплификация фрагментов кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и кДНК ВКО. Для амплификации специфического участка кДНК используются олигонуклеотиды, для детекции накопления специфического продукта используются флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды. В ходе реакции происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации в присутствии фермента Taq-полимеразы сопровождается

отщеплением флуоресцентной метки от зондов благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности. Олигонуклеотидный зонд к кДНК коронавируса SARS-CoV-2 имеет флуоресцентную метку, позволяющую проводить регистрацию флуоресценции по каналу детекции JOE/HEX, олигонуклеотидный зонд к кДНК ВКО имеет флуоресцентную метку, позволяющую проводить регистрацию флуоресценции по каналу детекции FAM.

Учет результатов и установление наличия РНК коронавируса SARS-CoV-2 производится путем анализа данных о пороговом цикле флуоресценции (Ct) образца, при этом наблюдается обратная зависимость значения цикла пороговой флуоресценции от количества целевой РНК в пробе. Так, наименьшее значение циклов соответствует максимальной концентрации РНК коронавируса SARS-CoV-2. В образцах, не содержащих целевой РНК, флуоресценция, детектируемая по каналу JOE/HEX, отсутствует.

ПЦР необходимо проводить на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам FAM/Green и HEX/Orange планшетного (например, CFX96) или роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 или Rotor-Gene Q).

### **3.2. Состав МИ**

Набор реагентов COVID-2019 Amp выпускается в одном варианте комплектации, рассчитанном на 100 определений, включая положительный и отрицательный контрольные образцы (табл. 1).

Реактив Amp 1RT представляет собой буферный раствор, содержащий 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0 (при 25°C), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 0,1% (v/v) NP-40, ингибитор РНКаз, M-MuLV –РН ревертазу и HS-Taq ДНК-полимеразу.

Реактив Amp 1B представляет собой буферный раствор, содержащий 100 мМ Трис-НСl, рН 8,3 (при 25°C), 150 мМ KCl, 0,6 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 8 мМ дитиотреитол, стабилизаторы и усилители ферментов.

Реактив Amp 2 содержит олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды.

K+ представляет собой смесь двух типов кДНК: кДНК SARS-CoV-2 и кДНК ВКО, содержащих специфическую последовательность нуклеотидов ДНК, амплифицируемую с участием Реактива Amp 2.

K- представляет собой дистиллированную воду.

ПКО представляет собой взвесь псевдовиральных частиц на основе фага MS2, содержащих фрагмент РНК SARS-CoV-2, амплифицируемый в реакции ОТ-ПЦР с участием Реактива Amp 2.

ОКО представляет собой дистиллированную воду.



ВКО представляет собой взвесь псевдовиральных частиц на основе фага MS2, содержащих нуклеотидную последовательность искусственной РНК, амплифицируемую в реакции ОТ-ПЦР с участием праймеров к ВКО и детектируемую с участием зондов к ВКО в составе Реактива Amp 2.

#### 4. Меры предосторожности

4.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические (ПЦР) или бактериологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями III-IV групп патогенности, специально обученным персоналом.

**Таблица 1. Состав медицинского изделия**

Наименование реагента	Описание	Количество в наборе, шт.	Объем компонента, мл
Реактив Amp 1RT	Прозрачная или слабо опалесцирующая слабовязкая жидкость	1	0,11
Реактив Amp 1B	Прозрачная или слабо опалесцирующая слабовязкая жидкость	1	1,3
Реактив Amp 2	Прозрачная жидкость со слабым розовым оттенком	1	0,16
К+ положительный контроль ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	1	0,11
К- отрицательный контроль ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость	1	0,5
ПКО положительный контрольный образец обратной транскрипции	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1,1
ОКО отрицательный контрольный образец обратной транскрипции	Прозрачная бесцветная жидкость	1	0,5
ВКО внутренний контрольный образец выделения РНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1,1

**4.2.** При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до 28°C, относительная влажность от 15 до 75%;
- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в зоне экстракции (№ 1), продолжать в зонах амплификации (№ 2) и детекции (№ 3). Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;
- уничтожать образцы в соответствии с санитарно-эпидемическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)»;
- использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;
- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 минут;
- набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»);
- набор реагентов готов к применению. Применять набор строго по назначению;
- к работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы с микроорганизмами III группы патогенности в установленном порядке (Санитарно-эпидемические правила СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)»);
- не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию;
- не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- не использовать набор реагентов по истечении срока годности;
- использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека;

- избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью;
- при соблюдении условий транспортирования, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют;
- информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

**4.3.** Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности МИ безопасно.

### **5. Требуемое дополнительное оборудование и материалы**

МИ не содержит реагентов для выделения РНК! Проведение ОТ-ПЦР и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени проводится в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот, и нуждается в применении следующего дополнительного оборудования и материалов:

- 1) Программируемый термоциклер с функцией амплификации в режиме «реального времени» с наличием двух каналов детекции флуоресценции (FAM/SybrGreen/Green и JOE/HEX);
- 2) Бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс) – 2 шт. (для приготовления реакционной смеси и для раскапывания образцов ДНК);
- 3) Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8°C и от –18 до –25°C.
- 4) Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, набор из трех дозаторов объемом 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл);
- 5) Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток переменного объема: до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл, свободные от РНКаз и ДНКаз, стерильные;
- 6) Емкость для сброса отработанных расходных материалов;
- 7) Комплект спецодежды – халат, шапочка, обувь, предназначенные для работы в каждой зоне отдельно;
- 8) Резиновые (латексные, нитриловые, виниловые) неопудренные перчатки одноразового применения;
- 9) Пробирки, стрипы или планшеты (в зависимости от количества проб, анализируемых в ходе одного эксперимента), совместимые с моделью термоциклера, из оптически прозрачного пластика для ПЦР;
- 10) Пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл;
- 11) Штативы для микропробирок объемом 0,6-1,5 мл;
- 12) Штативы (3 шт.) для наконечников объемом 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл;

- 13) Штативы для оптически-прозрачного пластика;
- 14) Миницентрифуга-вортекс со сменными роторами: 1) ротор для ПЦР-планшетов, с крышкой-фиксатором; 2) ротор для микропробирок объемом 0,6-1,5 мл; 3) ротор для стрипов;
- 15) Раствор для деконтаминации (в случае контаминации) (0,2%-ный раствор ДП-2Т, хлорацета или аналогичный).

## **6. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала**

Исследованию подлежит материал, полученный при взятии мазка из носа и/или зева. Все работы с клиническим материалом, подозрительным на заражение коронавирусом вида SARS-CoV-2, включая забор, транспортирование и подготовку материала для исследований, проводятся в соответствии с действующими нормативными и методическими документами, регламентирующими деятельность с возбудителями III-IV групп патогенности, согласно санитарным правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)» и согласно требованиям МУ 1.3. 2569-09 и СП 1.2.036-95.

## **7. Проведение исследования**

### **7.1. Меры предосторожности**

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Все работы проводятся при +20...+28°C и относительной влажности воздуха 15-75%.

#### **7.1.1. Меры предосторожности для оператора**

Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.

Необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами, тщательно вымыть руки по окончании работы.

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

Необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром дозаторов.

Не допускается повторное использование наконечника.

Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

### 7.1.2. Меры предотвращения контаминации

Этапы работы необходимо проводить в отдельных помещениях в условиях изолированных зон, оснащенных необходимыми расходными материалами и оборудованием, в работе с набором реагентов задействованы следующие зоны:

- Зона № 1 для работы с геномной ДНК/РНК – подготовка исследуемых образцов;
- Зона № 2 для подготовки и проведения ОТ-ПЦР;
- Зона № 3 для учета результатов.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится пробоподготовка и ОТ-ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ не менее 30 минут.

### 7.2. Требования к персоналу

Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться специалистами, имеющими достаточную квалификацию.

### 7.3. Экстракция РНК из клинического материала

Использование набора подразумевает работу с готовыми образцами РНК, выделенными из клинического материала. **В состав набора не входят реагенты для выделения РНК.** Для выделения РНК из клинических образцов рекомендуется использовать комплекты реагентов, предназначенные для выделения ДНК/РНК из клинического материала, и прошедшие государственную регистрацию в соответствии с Правилами государственной регистрации медицинских изделий, утвержденными постановлением Правительства РФ от 27.12.2012. № 1416 (например, Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп», РУ ФСР 2008/03147).

В зоне № 1 проводят экстракцию РНК комплекта реагентов «РИБО-преп» согласно инструкции производителя (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). **Экстракция РНК из каждого исследуемого образца, включая ПКО и ОКО, проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО) в объеме 10 мкл.**

В качестве положительного контроля обратной транскрипции РНК используется 100 мкл ПКО.

В качестве отрицательного контроля обратной транскрипции используется 100 мкл ОКО.

Полученные образцы РНК хранят в течение года при температуре не выше  $-16^{\circ}\text{C}$ . Перед выполнением протокола рекомендуется оценить концентрацию РНК. Перед началом работы необходимо удостовериться в соответствии качества РНК требованиям: концентрация РНК должна составлять от 10 до 100 нг/мкл. Для дальнейшего исследования образцы РНК, ОКО и ПКО перенести в зону № 2.

#### **7.4. Подготовка образцов к постановке ОТ-ПЦР**

**7.4.1.** В зоне №2 разморозить при комнатной температуре следующие компоненты набора: Amp1B, Amp1RT, Amp2, K+, K-, а также образцы исследуемого материала, если они хранились в замороженном состоянии.

**7.4.2.** Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе, не допуская образования пены; осадить капли в микроцентрифуге в течение 5 с.

**7.4.3.** Рассчитать необходимый объем компонентов для общей реакционной смеси, исходя из количества исследуемых образцов. Учесть необходимость постановки положительных и отрицательных контролей реакции K+, K-, ОКО и ПКО (табл. 2).

**Таблица 2. Компоненты реакционной смеси**

<b>Компонент</b>	<b>Объем на одну реакцию</b>
Реактив Amp 1RT	1 мкл
Реактив Amp 1B	12,5 мкл
Реактив Amp 2	1,5 мкл

**7.4.4.** Приготовить общую реакционную смесь.

**7.4.5.** Тщательно перемешать общую реакционную смесь встряхиванием на вортексе; осадить капли со стенок пробирок в микроцентрифуге в течение 5 с.

**7.4.6.** Подготовить пробирки/стрипы/планшет для ПЦР (в зависимости от числа проб и типа амплификатора): установить в штатив, промаркировать, надписи должны быть минимальными, не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом, избегать надписей на поверхностях пластика, задействованных в детекции флуоресценции.

**7.4.7.** Внести по 15 мкл общей реакционной смеси во все пробирки (лунки) для ПЦР в соответствии с числом исследуемых проб.

**7.4.8.** Подготовить контрольные и исследуемые образцы РНК. После размораживания контрольные и исследуемые образцы центрифугировать в микроцентрифуге в течение 5 с для осаждения капель со стенок и крышки.

**7.4.9.** Добавить 10 мкл ОКО в пробирки для ПЦР, соответствующие отрицательным контрольным образцам этапа выделения РНК.

**7.4.10.** Добавить 10 мкл K- в пробирки для ПЦР, соответствующие отрицательным контрольным образцам ПЦР.

**7.4.11.** Добавить по 10 мкл РНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР.

**7.4.12.** Добавить 10 мкл К+ в пробирки для ПЦР, соответствующие положительным контрольным образцам этапа ПЦР.

**7.4.13.** Добавить 10 мкл ПКО в пробирки для ПЦР, соответствующие положительным контрольным образцам этапа обратной транскрипции РНК.

**7.4.14.** Закрывать крышки пробирок для ПЦР; осадить капли центрифугированием в микроцентрифуге в течение 10 с. Перенести пробирки с внесенными исследуемыми образцами, ПКО, ОКО К+ и К- в зону №3.

**7.4.15.** Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

**7.4.16.** Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры ПЦР в зависимости от типа амплификатора для ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (табл. 3), создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора, выбрать каналы детекции FAM и JOE/HEX, запустить программу амплификации.

**Таблица 3. Условия проведения амплификации и детекции результатов**

Температура, °С	Время	Количество циклов
50	15 мин	1
95	5 мин	1
95	10 с	40
57	30 с*	
Детекция флуоресцентного сигнала		
ВКО Специфический продукт		FAM JOE/HEX

Примечание: \* – детекция флуоресцентного сигнала.

### **7.5. Регистрация результатов**

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору. По каналу FAM регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК внутреннего контрольного образца, по каналу JOE/HEX регистрируется накопление фрагмента кДНК коронавируса SARS-CoV-2.

## **7.6. Анализ и интерпретация результатов**

### **7.6.1. Анализ данных включает следующие этапы:**

- 1) первичная обработка данных;
- 2) контроль качества прохождения ПЦР;
- 3) анализ исследуемых образцов.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла  $C_t$ . Анализируемая проба считается положительной, если:

- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение порогового цикла  $C_t$  по каналу JOE/HEX;
- кривая флуоресценции по каналу JOE/HEX пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

### **7.6.2. Принцип интерпретации**

Учет результатов следует начинать с результатов амплификации  $K^+$ ,  $K^-$ , ПКО и ОКО.

#### **7.6.2.1. Результаты анализа не учитываются,**

- если во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM и/или JOE/HEX в пробирке с  $K^+$ , или полученные значения порогового цикла  $C_t$  для одного или обоих каналов выше граничных, указанных во вкладыше к набору; в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов, начиная с постановки ОТ-ПЦР;
- если во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM и/или JOE/HEX в пробирке с ПКО, или полученные значения порогового цикла  $C_t$  выше граничных, указанных во вкладыше к набору; в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов, начиная с выделения РНК;
- если в пробирке с  $K^-$  регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по одному из каналов, либо по всем каналам флуоресценции, необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов, начиная с этапа ОТ-ПЦР;
- если в пробирке с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу JOE/HEX, необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов, начиная с выделения РНК;



– если в пробирках с исследуемыми образцами не детектируется сигнал по каналу FAM, соответствующему ВКО, то в данном случае необходимо повторное исследование всех образцов, начиная с выделения РНК.

**7.6.2.2.** Результаты анализа учитываются, если:

– во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и JOE/HEX в пробирках с ПК<sup>+</sup> и К<sup>+</sup>;

– во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM и JOE/HEX в пробирке с К<sup>-</sup>;

– во время прохождения реакции детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM в пробирках с исследуемыми образцами (включая ОК<sup>+</sup>) и полученные значения порогового цикла C<sub>t</sub> ниже и равны граничному, указанному во вкладыше к набору.

**7.6.2.3.** При соблюдении требований пунктов 7.6.2.2. и 7.6.2.3. заключение о наличии либо отсутствии в анализируемом биологическом образце коронавируса SARS-CoV-2 делается в соответствии с таблицей 4.

**Таблица 4**

Анализируемый параметр	Наличие флуоресцентного сигнала	
	Канал FAM	Канал HEX
Образец положителен на наличие РНК SARS-CoV-2	25–35	15–37
Образец отрицателен на наличие РНК SARS-CoV-2	25–35	>37 или не определяется
Результат недостоверный	>35 или не определяется	15–37
	>35 или не определяется	>37 или не определяется

## **7.7. Аналитические и диагностические характеристики**

### **7.7.1. Аналитическая чувствительность**

Аналитическая чувствительность определена путем построения стандартной кривой на основе данных о пороговых циклах флуоресценции калибратора в ОТ-ПЦП (при ее эффективности (100±10%)) в ходе амплификации кДНК, синтезированной на матрице РНК, выделенной из последовательных десятикратных разведений взвеси псевдовирусных частиц фага MS2, в состав которого входит нуклеотидная последовательность РНК SARS-CoV-2 от 10<sup>4</sup> частиц/мл до ≤ 100 частиц/мл с учетом допущения, что эффективность выделения РНК близка к 100%. Установленная аналитическая чувствительность составляет не менее 1000 геномных эквивалентов вируса/мл.

### 7.7.2. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность оценена при использовании панели образцов РНК гетерологичных вирусов штаммов: Аденовируса 3 типа, Парагриппа 3 типа, ВПГ1/Ленинград/248/88 (Герпесвируса 1 типа), РС/Ленинград/285/76 (Респираторно-синцитиального вируса человека), HCV/Lp/Ленинград/2/77 (Коронавируса 229E). В ходе амплификации с образцами нуклеиновых кислот вышеперечисленных вирусов наблюдалось отсутствие регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналу JOE/HEX.

### 7.7.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определена как отношение количества истинно положительных результатов к сумме истинно положительных и ложноотрицательных результатов и составляет 95% (n = 66) при доверительной вероятности 95%.

### 7.7.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определена как отношение количества истинно отрицательных результатов к сумме истинно отрицательных и ложноположительных результатов и составляет 95% (n = 48) при доверительной вероятности 95%.

### 7.8. Предупреждения

Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2 и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов. Отрицательные результаты должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор реагентов COVID-2019 Amp не определяет наличие коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале, если его концентрация ниже 1000 копий/мл.

## 8. Условия транспортирования и хранения МИ

Срок годности – 12 месяцев со дня утверждения ОБТК производства, при соблюдении условий транспортирования и хранения.

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.

Транспортирование осуществляется при температуре от +2 до +8°C в течение не более 5 суток. **После доставки Набора внешнюю упаковку Набора необходимо незамедлительно вскрыть и поместить реагенты на хранение в соответствии с указанным на внутренней упаковке температурным режимом.**

Хранение до вскрытия и хранение после вскрытия для Реактива Amp 1RT, Реактива Amp 1B, Реактива Amp, K+, K-, ОКО осуществляется при температуре от –20 до –40°С.

Хранение до вскрытия и хранение после вскрытия для ПКО, ВКО осуществляется при температуре от +2 до +8°С.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, с нарушением целостности упаковки предприятия-изготовителя, использованию не подлежит.

Транспортирование набора реагентов может производиться любым видом крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта в пенопластовых контейнерах с гелевыми хладагентами при температуре от +2 до +8°С в течение 5 суток. **Замораживание набора при транспортировании не допускается!**

### **9. Указания по утилизации**

Отходы, образующиеся в ходе применения МИ, утилизируются в соответствии с типом отходов. При этом упаковка набора, компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

Учитывая потенциальную инфекционную опасность исследуемых образцов и их отходов, следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом, – остатки исследуемых образцов, не используемые для дальнейших исследований или биобанкирования, относятся к классу Б.

Утилизация, уничтожение, дезинфекция отходов проводятся в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

