

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<br>«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 | комплементарная 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 анализит:** 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 тромбозмболиями, 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.<sup>1</sup>

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

---

<sup>1</sup> 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 лицам.

**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 лицам.

**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 гибридизационно-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 гибридизационно-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.

Лиофилизированная реакционная смесь (LPC-Cito) для ОТ-ПЦР готова к использованию и содержит ревертазу с «теплым стартом», термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дНТФ, оптимизированный буфер, позволяющий проводить ОТ-ПЦР в присутствии большого количества ингибиторов, смесь криопротекторов, 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

| <b>Канал, соответствующий флуорофору</b> |            |
|------------------------------------------|------------|
| <b>FAM</b>                               | <b>HEX</b> |
| 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 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

#### **Состав набора реагентов**

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

| <b>№пп</b> | <b>Наименование реагента</b>        | <b>Описание</b>                              | <b>Количество, объём</b>                                                                     |
|------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.         | ЛРС-Cito                            | Сухая аморфная пористая масса розового 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                                                                          |

Лиофилизированная 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 зонды, 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 лиофилизированной реакционной смеси (ЛРС-Cito) для ОТ-ПЦР включен внутренний контрольный образец (ВКО), представляющий собой препарат НК.

Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой лиофилизированную 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                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Технические характеристики</b>    |                                                                                                                                                                  |
| 1.1 Внешний вид                         |                                                                                                                                                                  |
| ЛРС-Cito                                | Сухая аморфная пористая масса розового 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                                                                                                         |
| <b>2. Функциональные характеристики</b> |                                                                                                                                                                  |
| 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 повторях (не менее 3) Ct $\leq$ 38 и при значении стандартного отклонения в повторях 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 повторях (не менее 3) Ct $\leq$ 38 и при значении стандартного отклонения в повторях 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 генов *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 ОТ-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™), *Chlamydophila 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  $1 \times 10^9$  ГЭ/мл и не менее  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^9$  ГЭ/мл и не менее  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл;

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

Сморединцева»: 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  $1 \times 10^9$  ГЭ/мл и не менее  $1 \times 10^7$  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 (табл. 4), 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 ОТ-ПЦР.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 4

**Таблица 4 – Анализ результатов проведенного исследования**

| <b>Тип</b> | <b>Вещество</b>                                 | <b>Активный компонент</b>      | <b>Концентрация</b> |
|------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| 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 носа 1                 | Кромолин                       | 15 % об/об          |
|            | Безрецептурный спрей для носа 2                 | Оксиметазолин                  | 15 % об/об          |
|            | Безрецептурный спрей для носа 3                 | Флуконазол                     | 5 % мас/об          |
|            | Леденец от боли в горле                         | Бензокаин, Ментол              | 0,15 % мас/об       |
|            | Безрецептурный гомеопатический спрей для носа 1 | Гальфимия глаука, Сабадилла    | 20 % об/об          |
|            | Безрецептурный гомеопатический спрей для носа 2 | Глюконат цинка                 | 5 % мас/об          |
|            | Безрецептурный гомеопатический спрей для носа 3 | Алкалол                        | 10 % об/об          |
|            | Безрецептурный гомеопатический спрей для носа 4 | 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                       | Мупиноцин                      | 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 ОТ-ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ОТ-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 с 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 повторях для расчета процента положительных результатов. Результаты определялись в соответствии с международными рекомендациями CLSI EP-17A2 пробит-анализом.

Для проведения ОТ-ПЦР-исследования набором реагентов «Cito-CoV-2-Test-L» 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), QuantStudio 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 5

Таблица 5

| 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 | $u_{p.5} = 0,06$<br>$u_{cal} = 0,33$ |                                        |                                        |                                        |                                        |

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

В соответствии с п. 4.7.1 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 %):

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

$u_{cal} = 0,92 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$  – 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  $U_{max}(y)$ :

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

$U(y)=0,92 \leq U_{max}(y)=2$  – 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 6

Таблица 6

| Аналит                                                     | Образец                                                                                                          | Тип образца        | Неопределенность измерений | Суммарная стандартная неопределенность | Расширенная суммарная неопределенность |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U-937 | Вторичный СО - геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U-937 (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 СамГМУ 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 СамГМУ 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:

- CFX 96 (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 % (табл. 7).

Таблица 7

| Вид исследуемого материала      | Количество наблюдений с положительным и 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 %<br>(95 % ДИ:96,23 %-100 %)                                   | 100 %<br>(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*, *Chlamydomphila 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 В линия Виктория, Influenza virus В 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 исследуемой РНК 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 <sup>1</sup>.

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

---

<sup>2</sup> 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-эпидемических 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 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»;

**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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- не использовать набор по истечении срока годности;

- 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 -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. Амплификатор<sup>3</sup> с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM, HEX

- 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,

---

<sup>3</sup> 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.

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 1 000 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 1 000 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 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 °С. Время хранения образцов до исследования не должно превышать 5 дней при 2-8 °С, может быть больше при -20 °С или -70 °С.

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 опечатывается и маркируется. В контейнер желательно поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение температуры от 2 °С до 8 °С. Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются 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 1.

**ВНИМАНИЕ!** Лиофилизированную 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. Плотнo 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 упаковать в пакет с осушителем, удалить воздух и плотно закрыть. После первого вскрытия упаковки ЛРС хранить при температуре от 2 °C до 8 °C не более 3 месяцев.

## 10. Проведение анализа

Исследование состоит из следующих этапов:

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

### **А. Подготовка ОТ-ПЦР**

Для проведения одной реакции необходимо:

1. Пробирки со смесью ЛРС-Cito – 1 шт.
2. Раствор для восстановления ЛРС-Cito – 20 мкл.
3. Образец (исследуемый образец) – 5 мкл
4. 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 с ЛРС-Cito необходимо согласно таблице 8 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки с ЛРС-Cito в соответствии с протоколом (с учетом ПКО и ОКО).
2. Аккуратно удалить пленку с пробирок, следя, чтобы лиофильная смесь ЛРС не была удалена вместе с пленкой.
3. Внести в соответствующие пробирки раствор для восстановления ЛРС-Cito 20 мкл.
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5 мкл образца и осторожно перемешать пипетированием. В пробирки для ПКО и ОКО образец не вносится.
5. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ПКО и осторожно перемешать пипетированием.
6. Внести в соответствующую пробирку 5 мкл ОКО и осторожно перемешать пипетированием.
7. Заклеить планшет/пробирки оптически прозрачной пленкой для проведения ПЦР.
8. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.
9. Выдерживать пробирки в течение 3–5 минут для

восстановления реакционной смеси при комнатной температуре.

Таблица 8 – Пример расположения пробирок и внесения компонентов для проведения ОТ-ПЦР

| Компонент                                | Образец 1            |    | Образец 2            |    | Контроли |     |
|------------------------------------------|----------------------|----|----------------------|----|----------|-----|
|                                          | повторы <sup>1</sup> |    | повторы <sup>1</sup> |    | 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 к-ДНК 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 9.

Таблица 9 – 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            | FAM HEX         | 45           |
|        | 64              | 00:20            |                 |              |

В случае использования амплификатора ДТпрайм необходимо произвести настройку экспозиции: Fam – 500, Hex – 1000.

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

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green и HEX/Yellow.

5. Запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

## **11. Регистрация и интерпретация результатов**

Регистрацию результатов проводят автоматически по завершении 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 10).

Таблица 10 – Результаты исследования для отрицательного и положительного 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 10, 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 10, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

## Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принцип интерпретации результатов отражён в таблице 11 и выполняется в следующем порядке:

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

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов

| Значение порогового цикла (Ct) по каналам |                              | Результат                                 |
|-------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|
| FAM                                       | HEX                          |                                           |
| отсутствует                               | $Ct \leq 32$                 | РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена |
| $Ct \leq 38$                              | не учитывается <sup>4</sup>  | РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена    |
| $Ct > 38$<br>или отсутствует              | $Ct > 32$<br>или отсутствует | Результат невалидный                      |
| $Ct > 38$                                 | $Ct \leq 32$                 | Результат сомнительный                    |

### Принцип интерпретации результатов:

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

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

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

Причиной получения невалидного результата может служить высокая концентрация ингибиторов в клиническом образце, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ОТ-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 °С до 25 °С 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 °С до 25 °С в течение всего срока годности набора.

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 °С до 8 °С – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации;

- ПКО после восстановления хранить при температуре от -18 °С до -22 °С в течение 1 года или при температуре от 2 °С до 8 °С 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 °С до 8 °С не более 3 месяцев. 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](http://www.testgen.ru)

**Служба технической поддержки:**

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: [help@testgen.ru](mailto: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 in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.                                        |
| ГОСТ Р ИСО 23640-2015   | Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.                                                                                                                         |
| ГОСТ Р 51352-2013       | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.                                                                                                                                                               |
| ГОСТ Р ЕН 13612-2010    | Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.                                                                                                                                             |
| ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.                                                                       |
| ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.                                            |
| ГОСТ Р ИСО 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 in vitro. Требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, приписанных калибраторам, контрольным материалам правильности и образцам биологического материала человека |