

УТВЕРЖДАЮ
Ген Директор ПОЛЫНЦЕВ Д.А.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набора реагентов для выявления РНК коронавируса *SARS-CoV-2*

методом ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
«**Интифика *SARS-CoV-2***», серии E001, E002

Интифика *SARS-CoV-2*

Форма 1

кат. № 470-01

Интифика *SARS-CoV-2*

Форма 2

кат. № 470-02

Интифика *SARS-CoV-2*

Форма 3

кат. № 470-03

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор «Интифика *SARS-CoV-2*» предназначен для качественного выявления РНК коронавируса *SARS-CoV-2* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в препаратах нуклеиновых кислот (НК), полученных из клинических образцов мазков носоглотки и/или ротоглотки, промывных вод бронхов, полученных при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж).

1.2. Показания к применению.

Набор реагентов «Интифика *SARS-CoV-2*» может быть использован в клинической лабораторной диагностике для выявления коронавируса *SARS-CoV-2* – возбудителя новой коронавирусной инфекции COVID-19, потенциально вызывающей острый респираторный синдром. Определение коронавируса *SARS-CoV-2* показано для лиц, контактировавших с заболевшими COVID-19, а также лиц с клинической симптоматикой ОРВИ с подозрением на инфекцию COVID-19 и лиц без симптомов ОРВИ в очагах инфекции с целью раннего выявления *SARS-CoV-2* для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

Полученные результаты должны использоваться в сочетании с данными анамнеза и клинического обследования. Отрицательные результаты не исключают наличия инфицирования коронавирусом *SARS-CoV-2* и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о необходимости лечения.

1.3. Функциональное назначение: набор предназначен для выявления возбудителя коронавирусной инфекции COVID-19 в образцах биоматериала человека.

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика *in vitro*.

1.5. Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

1.6. Противопоказания к применению. Набор не имеет противопоказаний к применению.

1.7. Исследования проводят в клиничко-диагностических лабораториях, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, областных, городских, районных государственных или частных больницах и других ЛПУ.

Набор предназначен только для профессионального применения.

Исследования с использованием данного набора реагентов могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием: врач КДЛ, врач-бактериолог, биолог, медицинский лабораторный техник, медицинский технолог. Персонал, проводящий исследования с использованием данного набора реагентов, должен владеть навыками проведения молекулярно-биологических исследований и работы на соответствующем оборудовании.

1.8. Набор предназначен для однократного применения.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-533-98539446-2020.

2.1. Состав набора

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт и вкладыш.

Набор выпускается в трех вариантах исполнения:

Вариант исполнения «**Форма 1**» состоит из набора реагентов, предназначенного для выявления РНК *SARS-CoV-2* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «Интифика *SARS-CoV-2*».

Вариант исполнения «**Форма 2**» состоит из комплектов реагентов, предназначенных для выделения НК из клинических образцов и выявления РНК *SARS-CoV-2* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Вариант исполнения «**Форма 3**» состоит из комплектов реагентов, предназначенных для транспортировки и хранения клинических образцов «Транспортная среда (ТС)», выделения НК из клинических образцов и выявления РНК *SARS-CoV-2* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Вариант исполнения	Состав	Фасовка
Форма 1	<u>Набор реагентов для ОТ-ПЦР</u> 1. ПЦР-смесь-SC2 2. Ферменты (Taq + RT) 3. ПКО – положительный контрольный образец 4. Вода без нуклеаз	1 шт. 1 пробирка (1020 мкл) или 100 отдельных ПЦР-пробирок (по 10 мкл) 1 пробирка (510 мкл) 1 пробирка (лиофилизат) 1 пробирка (150 мкл)
Форма 2	<u>Набор реагентов для ОТ-ПЦР</u> 1. ПЦР-смесь-SC2 2. Ферменты (Taq + RT) 3. ПКО – положительный контрольный образец 4. Вода без нуклеаз <u>Комплект для выделения РНК</u> 1. Лизирующий буфер 2. Осадитель НК 3. Раствор для отмывки 4. Буфер для растворения НК 5. ОКО – отрицательный контрольный образец	1 шт. 1 пробирка (1020 мкл) или 100 отдельных ПЦР-пробирок (по 10 мкл) 1 пробирка (510 мкл) 1 пробирка (лиофилизат) 1 пробирка (150 мкл) 1 шт. 1 флакон (30 мл) 1 флакон (40 мл) 2 флакона (по 50 мл) 1 флакон (10 мл) 1 пробирка (1,5 мл)
Форма 3	<u>Набор реагентов для ОТ-ПЦР:</u> 1. ПЦР-смесь-SC2	1 шт. 1 пробирка (1020 мкл) или 100 отдельных ПЦР-пробирок (по 10 мкл)

Вариант исполнения	Состав	Фасовка
	2. Ферменты (Taq + RT) 3. ПКО – положительный контрольный образец 4. Вода без нуклеаз <u>Комплект для выделения РНК:</u> 1. Лизирующий буфер 2. Осадитель НК 3. Раствор для отмывки 4. Буфер для растворения НК 5. ОКО – отрицательный контрольный образец <u>Реагент для хранения и транспортировки клинических образцов:</u> 1. Транспортная среда (ТС)	1 пробирка (510 мкл) 1 пробирка (лиофилизат) 1 пробирка (150 мкл) 1 шт. 1 флакон (30 мл) 1 флакон (40 мл) 2 флакона (по 50 мл) 1 флакон (10 мл) 1 пробирка (1,5 мл) 1 шт. 100 пробирок (по 0,5 мл)

Все реагенты за исключением ПКО в составе набора готовы к применению. Лиофилизированный ПКО перед первым использованием необходимо восстановить (см. п. 7.1.1).

Набор рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контроли. Положительный контроль ПЦР (К+), входящий в состав набора как ПКО (препарат, содержащий синтезированные выявляемые последовательности РНК вируса) служит для подтверждения нормального прохождения этапов ревертирования и ПЦР. Отрицательный контрольный образец (К-) – ОКО (препарат, не содержащий специфической НК, служит для исключения получения ложноположительных результатов в процессе исследования). Данные контроли должны быть включены в каждый эксперимент.

Вода без нуклеаз – компонент, необходимый для восстановления ПКО.

В состав реакционной смеси входят олигонуклеотиды для одновременной амплификации и детекции участков РНК-генома коронавируса и участка матричной РНК (мРНК) одного из генов «домашнего хозяйства» человека, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВК).

Применение эндогенного контроля амплификации стабильно экспрессируемого гена мРНК человека позволяет оценить влияние следующих факторов на достоверность результата для каждого исследуемого образца:

- правильность сбора биоматериала;
- возможная деградация РНК в биоматериале;
- потери РНК при выделении;
- эффективность прохождения обратной транскрипции и амплификации.

Во вкладыше к набору указаны граничные значения Cq^1 для проб РНК и контролей (Cq_{ORF1} , Cq_{ORF8} , Cq_N , $Cq_{ПК}$ и $Cq_{ВК}^2$), что позволяет контролировать эффективность ПЦР анализа, начиная с этапа экстракции РНК. Допустимые значения пороговых циклов: для Cq_{ORF1} , Cq_{ORF8} и $Cq_N \leq 45$, для $Cq_{ПК}$ и $Cq_{ВК} \leq 35$. Точные значения определяют в ходе аттестации серии набора и указывают во вкладыше к набору для валидированных амплификаторов.

2.2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип действия набора реагентов «Интифика-SARS-CoV-2» основан на методе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции для выявления специфичных участков-мишеней РНК-генома коронавируса SARS-CoV-2. Все реакции проводятся в одной пробирке.

На первом этапе на матрице выделенной РНК образца фермент обратная транскриптаза (RT) нарабатывает фрагменты кДНК, которые будут служить матрицей для последующей реакции амплификации и детекции. На втором этапе в процессе амплификации с использованием мишень-специфичных праймеров происходит накопление фрагментов ДНК мишеней, с которыми, в свою очередь, гибридизуются мишень-специфичные флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды. В ходе реакции происходит расщепление зондов с высвобождением флуорофора, фиксируемое прибором как возрастание интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. После завершения реакции происходит анализ полученных кривых и значений их характеристических точек Cq , на основании которых интерпретируются результаты.

РНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток в мазке. Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию РНК, проведение этапов ревертирования и амплификации), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. В случаях, если мазок взят неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток), сигнал амплификации ВК будет заниженным.

Реагент для хранения и транспортировки Транспортная среда (ТС) представляет собой стерильный водно-солевой бесцветный буферный раствор, готовый к применению. В состав ТС входит консервант, который препятствует росту неспецифической микрофлоры и преждевременному лизису, тем самым обеспечивая стабильность РНК в течение длительного времени в широком диапазоне температур.

¹ Cq - общее обозначение характеристической точки кривой флуоресценции (соответствует C_t , C_p).

² Граничные значения для Cq при амплификации 3-х участков субгеномных РНК: ORF1ab, ORF8 и N, а также ПК и эндогенного ВК, соответственно.

Комплект для выделения РНК используется для экстракции РНК из клинических образцов методом спиртового осаждения. На первой стадии при термической обработке происходит разрушение мембран клеток и органелл, выход свободных нуклеиновых кислот в раствор. На этапе преципитации все содержащиеся в образце нуклеиновые кислоты переходят в осадок, в то время как другие компоненты клинического материала остаются в растворе и удаляются аспирацией. На следующей стадии осадок дважды отмывают от остатков реагентов, использованных на предыдущем этапе, и от других примесей. На заключительной стадии НК растворяют и надосадочную жидкость, содержащую очищенную РНК, используют для ПЦР-исследования.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Аналитическая чувствительность:

Аналитическая чувствительность при выделении РНК из мазков из носоглотки и/или ротоглотки, промывных вод бронхов, полученных при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж), составляет 10^3 ГЭ³ /мл SARS-CoV-2 в прошедшей обработку (выделение РНК) пробе⁴.

3.2. Аналитическая специфичность:

Определяется как способность теста обнаруживать только аналит в присутствии интерферирующих НК в исследуемом материале.

Поскольку нельзя исключить возникновения новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2, для повышения надежности диагностики в качестве мишеней выбраны три участка генома, специфичных для коронавируса SARS-CoV-2: в гене *ORF1ab* (кодирует 1ab полипротеин, участвующий в сборке РНК-зависимой РНК-полимеразы), в гене *N* (кодирует белок фосфопротеин нуклеокапсида) и в гене *ORF8* (кодирует акцессорный белок).

Способность набора специфически определять РНК SARS-CoV-2 в присутствии РНК нижеперечисленных микроорганизмов достигнута путем подбора праймеров и зондов к высокоспецифичным фрагментам РНК SARS-CoV-2, что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора подтверждена методом выравнивания последовательностей целевых специфических участков с геномами человека, домашних животных, а также близкородственных и других возбудителей респираторных инфекций, составляющих микрофлору ротовой полости, носоглотки и нижних дыхательных путей человека.

³ ГЭ – суммарное количество генетического материала в 1 клетке.

⁴ Значение определено при использовании комплекта реагентов для выделения НК, входящего в состав набора «Интифика-SARS-CoV-2», а также наборов для экстракции НК, рекомендуемых ООО «Компания Алкор Био».

Набор обеспечивает отсутствие неспецифических реакций при тестировании образцов НК человека, а также следующих микроорганизмов: *Human coronavirus 229E*, *Human coronavirus OC43*, *Human coronavirus HKU1*, *Human coronavirus NL63*, *SARS-coronavirus*, *MERS-coronavirus*, *Adenovirus* (e.g. C1 Ad. 71), *Human Metapneumovirus (hMPV)*, *Parainfluenzavirus 1-4*, *Influenza A & B*, *Enterovirus* (e.g. EV68), *Respiratory syncytial virus*, *Rhinovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pneumocystis jirovecii* (PJP), *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus salivarius*.

3.3. Диагностические характеристики:

В ходе клинических испытаний Набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Интифика SARS-CoV-2», серии E001, E002 было проведено исследование 130 образцов клинического материала, включая:

- 20 – мазков из ротоглотки
- 20 – мазков из носоглотки
- 40 – мазков из носоглотки и ротоглотки
- 50 – образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ)

Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 95 % составила 95,5 % (суммарно, для препаратов НК из всех исследованных клинических образцов). Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности – 95,5 %.

Показатели диагностических характеристик для разных видов клинических образцов соответствуют значениям, приведенным в таблице.

Клинический материал	Исследуемая НК	Результаты испытаний	
		Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Мазки из ротоглотки и носоглотки	РНК SARS-CoV-2	92,8 – 100 %	92,8 – 100 %
Бронхоальвеолярный лаваж		88,7 – 100 %	88,7 – 100%

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И РЕКОМЕНДАЦИИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – 3 (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

Коронавирус SARS-CoV-2 относится ко II группе патогенности.

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

Следует рассматривать анализируемые образцы как инфекционно-опасные и обеспечивать условия для безопасного хранения и работы.

4.3. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.5. Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников с аэрозольным барьером для полуавтоматических пипеток. Для каждого образца РНК (в том числе контролей) использовать отдельный наконечник.

4.6. Каждый этап анализа должен проводиться в отдельных рабочих зонах. Выделение РНК следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком.

4.7. Постановку ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксе. Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.8. При работе с ПКО следует соблюдать особую осторожность, так как его разбрызгивание может привести к контаминации и, как следствие, к ложноположительным результатам.

4.9. При удалении отходов не допускать открывания пробирок с продуктами ПЦР и их разбрызгивания, так как это может привести к контаминации рабочих поверхностей и оборудования.

4.10. Перед началом работы ознакомьтесь с пользовательскими инструкциями на все используемое оборудование и комплекты реагентов. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

4.11. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно необходимо подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

4.12. Набор реагентов с истекшим сроком годности, нарушением условий транспортирования и хранения, при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору, при нарушении внутренней упаковки компонентов набора применению не подлежит.

4.13. Наборы, в которых обнаружена контаминация реагентов, должны быть утилизированы как биологический материал.

4.14. Все использованные одноразовые материалы, остатки образцов биоматериала, образующиеся в клинико-диагностических лабораториях, относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы) и должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.15. Все компоненты набора, в используемых концентрациях, являются **нетоксичными**. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности безопасны.

4.16. Внимание! В состав **ПЦР-смеси-SC2, Ферментов (Taq+RT) и ОКО**, а также **Транспортной среды (ТС)** входит азид натрия в концентрациях 0,02 - 0,05 %. При попадании компонентов с ним на кожу смыть большим количеством воды с мылом. При попадании в глаза промыть глаза водой. При попадании в желудок прополоскать рот водой. Получить консультацию у врача.

4.17. Внимание! Лизирующий буфер содержит хаотропные агенты в высоких концентрациях. При работе с набором необходимо использовать одноразовые перчатки.

4.18. Внимание! При работе с легковоспламеняющимися жидкостями (**Осадитель НК и Раствор для отмывки**) необходимо соблюдать правила пожарной безопасности.

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ПЦР бокс;
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, имеющий каналы FAM, ROX, HEX, Cy5;
- центрифуга для пробирок 0,2 и 1,5 мл с модулем вортекса со скоростью вращения 2400 об/мин;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: от 0,5 до 10 мкл, от 10 до 100 мкл, от 100 до 1000 мкл;
- наконечники к пипеткам полуавтоматическим с аэрозольным барьером, сертифицированные на отсутствие ДНКаз, РНКаз и других ингибиторов ПЦР;
- штативы для микропробирок объемом 0,2 и 1,5 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру +2...+8 °С;

- отдельные халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки (разрешенные к применению на территории РФ) по МУ 1.3.2569-09;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса наконечников, пробирок и других расходных материалов.
- В случае использования набора вариантов исполнения «Форма 2» или «Форма 3» дополнительно потребуются:
 - для получения клинических образцов мазков из носоглотки и/или ротоглотки с целью последующего их помещения для транспортировки и хранения в Транспортную среду (ТС) – одноразовые стерильные зонды-тампоны;
 - для экстракции образцов РНК коронавируса из клинических образцов мазков носоглотки и/или ротоглотки, а также бронхоальвеолярного лаважа с использованием набора для выделения:
 - ламинарный бокс (класс биологической безопасности II тип А);
 - термостат твердотельный для пробирок 1,5-2 мл, поддерживающий температуру до +100 °С;
 - микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» со скоростью вращения до 13 тыс. об/мин.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования являются препараты нуклеиновых кислот, полученные из клинических образцов мазков из носоглотки и/или ротоглотки, промывных вод бронхов, полученных при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж).

6.1. Взятие, транспортировка и хранение клинических образцов

Взятие, транспортировку и хранение исследуемого биоматериала необходимо осуществлять согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и Временными методическими рекомендациями «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV)», утвержденными Главным государственным врачом Российской Федерации 21.01.2020.

Хранение и транспортировку образцов необходимо осуществлять с применением Транспортной среды (ТС), входящей в состав набора. Допустимо использование других транспортных сред, зарегистрированных в РФ, предназначенных для хранения и транспортировки биоматериала с целью проведения молекулярно-генетических исследований. Транспортные среды, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био», предоставлены на сайте <http://forpcr.ru/info/>.

Транспортировку клинического материала необходимо осуществлять в специальных термоконтейнерах с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре +2...+8 °С.

Клинические образцы, помещенные в Транспортную среду (ТС) в плотно закрытой пробирке можно транспортировать и хранить:

- при температуре +2... +8 °С до 5 суток;
- для более длительного хранения (до 1 года) при температуре -18...-22 °С и ниже образцы желательно аликвотировать порциями по 0,1-0,2 мл в отдельные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. При анализе на наличие инфекционной РНК допустимо только однократное замораживание образца.

6.1.1. Порядок работы

6.1.1.1. Отобрать и промаркировать необходимое для работы количество пробирок с ТС.

6.1.1.2. Перед открыванием пробирок стряхнуть капли жидкости со стенок и внутренней части крышки на дно.

6.1.2. Взятие клинического материала

В зависимости от вида клинического материала действовать согласно пунктам 6.1.2.1. или 6.1.2.2.

6.1.2.1. Мазки эпителиальных клеток со слизистых оболочек ротоглотки, носоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами-тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки, аккуратно прижимая язык пациента шпателем. После забора материала рабочую часть зонда с тампоном поместить в пробирку с ТС, отломить его в области насечки (если имеется), оставить в пробирке. В случае отсутствия насечки, погрузить рабочую часть зонда в среду, и прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, после чего зонд необходимо удалить, предварительно отжав избыток жидкости о стенки пробирки, а пробирку плотно закрыть.

Внимание! Нельзя использовать зонды на деревянной основе.

Внимание! Нельзя касаться зондом языка!

Взятие мазков из носоглотки производят сухими стерильными зондами-тампонами. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, и удаляют вдоль наружной стенки полости носа, производя вращательные движения. После забора материала рабочую часть зонда с тампоном поместить в пробирку с ТС. Конец зонда отломить с расчётом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с ТС и рабочей частью зонда закрыть.

Примечание: Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание.

Внимание! При помещении в пробирку нельзя обрезать рабочую часть зонда ножницами.

Внимание! Рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после забора мазков у пациента помещаются в одну пробирку с транспортной средой и исследуются как один образец.

6.1.2.2. Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)

Сбор биологического материала для исследования следует проводить до назначения антибиотиков.

Взятие материала методом полученных фибробронхоскопии осуществляется в одноразовые, плотно заворачивающиеся пробирки объемом 50 мл. Бронхоальвеолярный лаваж перемешивают переворачиванием пробирки. Затем отбирают 1 мл клинического материала, помещают в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и центрифугируют при 7 тыс. об/мин в течение 10 минут. Удаляют 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,1 мл оставшейся жидкости.

6.2. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Оценка влияния интерферирующих веществ на эффективность ПЦР с использованием набора «Интифика SARS-CoV-2» показала отсутствие негативного эффекта при наличии в клинических образцах цельной крови – 5% об. и муцина – 5% об. при экстракции РНК с помощью комплекта, входящего в состав медицинского изделия, обеспечивающего получение высокоочищенной РНК. В случае использования других наборов для экстракции РНК, зарегистрированных на территории РФ и рекомендованных ООО «Компания Алкор Био» для соответствующего вида биоматериала, интерференции со стороны обычных эндогенных веществ не ожидается.

6.3. Экстракция РНК из клинических образцов

Для экстракции РНК из клинических образцов необходимо использовать комплект реагентов, входящий в состав набора.

Допустимо использовать наборы для экстракции РНК из клинических образцов мазков из носоглотки и/или ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, зарегистрированные в РФ и предназначенные для экстракции РНК из данного вида биоматериала.

Наборы для экстракции РНК, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био», предоставлены на сайте <http://forpcr.ru/info/>. В случае использования для экстракции РНК наборов других производителей, по вопросам их валидации совместно с наборами серии Интифика следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био».

Внимание! Каждая постановка должна содержать как минимум один К- (ОКО, прошедший этап экстракции).

6.3.1. Подготовка компонентов набора

- 6.3.1.1. Включить термостат, установить температуру +65 °С.
- 6.3.1.2. Если во флаконе с **Лизирующим буфером** наблюдается осадок, то необходимо прогреть и тщательно перемешать раствор до полного растворения осадка.
- 6.3.1.3. Отобрать и промаркировать необходимое для работы количество пробирок объемом 1,5 мл (по количеству исследуемых образцов, включая ОКО).
- 6.3.1.4. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническими образцами. Перед проведением процедуры выделения НК клинические образцы перемешать на вортексе, сбросить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

6.3.2. Протокол экстракции

- 6.3.2.1. В подготовленные пробирки внести по 300 мкл **Лизирующего буфера**.

Примечание: Лизирующий буфер следует набирать с мёртвым объёмом, вносить – без мёртвого объёма.

- 6.3.2.2. В подготовленные пробирки внести по **100 мкл** клинического материала, используя для каждого образца отдельный наконечник с аэрозольным барьером. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 100 мкл **ОКО**. Пробирки плотно закрыть. Перемешать на вортексе 3-5 секунд.

*Примечание: В качестве отрицательного контрольного образца допускается использовать **Буфер для растворения НК** или **Воду без нуклеаз**.*

- 6.3.2.3. Инкубировать при +65 °С в течение 10 минут в твердотельном термостате. В процессе инкубации необходимо тщательно перемешивать содержимое пробирок на вортексе через каждые 3 минуты в течение 5-7 секунд. Если у термостата предусмотрена функция шейкирования, вортексирование не требуется, достаточно выставить скорость вращения 1300 об/мин. По окончании инкубации достать пробирки из термостата, сбросить капли со стенок пробирок коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

Внимание! Пробирки должны быть плотно закрыты во избежание их открывания в процессе прогрева.

- 6.3.2.4. Добавить в пробирки по 400 мкл **Осадителя НК**, перемешать на вортексе 3-5 секунд.

- 6.3.2.5. Центрифугировать в течение 5 минут при 13 тыс. об/мин. Не задевая осадок, максимально отобрать супернатант медицинским отсасывателем.

Внимание! Если невозможно визуально различить осадок, отбор супернатанта следует проводить не полностью (оставить жидкость на уровне около 3 мм от дна пробирки).

Примечание: При использовании отсасывателя для каждой пробы использовать отдельный наконечник без фильтра.

6.3.2.6. Добавить к осадку 500 мкл **Раствора для отмывки**, перемешать на вортексе 5-10 секунд.

Примечание: Растворения осадка не происходит.

6.3.2.7. Центрифугировать в течение 3 минут при 13 тыс. об/мин. Не задевая осадок, максимально отобрать супернатант медицинским отсасывателем.

6.3.2.8. Провести вторую отмывку, повторив п.6.3.2.6.-6.3.2.7.

6.3.2.9. Подсушить осадок в пробирках с открытыми крышками при +65 °С в течение 3-5 минут.

Внимание! Не допускайте пересушивания осадка.

6.3.2.10. Добавить к осадку 60 мкл **Буфера для растворения НК**. Пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе и поместить в термостат с температурой +65 °С на 5 минут.

Примечание:

1. Допустимо при необходимости увеличить объём элюции до 100 мкл.

2. Осадок может раствориться не полностью.

6.3.2.11. После инкубации центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин.

6.3.2.12. Пробы готовы к использованию, надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

Внимание! Раствор высокоочищенной РНК, полученный в процессе экстракции, необходимо использовать для постановки ОТ-ПЦР в течение 20-30 минут.

Примечание: Пробы РНК можно хранить в течение 4 часов при температуре +2...+8 °С, в течение 2-х недель при температуре -18...-22 °С и в течение года при температуре не выше -68 °С.

Внимание! Перед повторным использованием пробы необходимо тщательно перемешать на вортексе и повторить центрифугирование в течение 1 минуты при 13 тыс. об/мин.

6.3.3. Устранение проблем

В процессе пробоподготовки могут возникать проблемы, в той или иной степени влияющие на результат анализа.

1. Низкий выход НК

- Использован избыточный объем образца. Не используйте объемы больше указанных в протоколе.
- Ненадлежащие условия хранения образца. Храните образцы в соответствии с инструкцией. Старайтесь использовать свежие образцы.
- Исходный материал не был полностью лизирован. Прогревайте **Лизирующий буфер** перед использованием до полного растворения осадка.
- Осадок НК не растворился. Избегайте пересушивания осадка.

2. ПЦР идет с низкой эффективностью

- Очищенная РНК содержит остатки раствора для отмывки. Максимально удаляйте раствор для отмывки и проводите высушивание осадка в соответствии с протоколом.

3. РНК разрушена

- Образец РНК был подвергнут неоднократному замораживанию. Избегайте повторения циклов замораживания-оттаивания. Используйте свежий образец для выделения РНК.
- Ненадлежащие условия хранения РНК. Храните образцы в соответствии с инструкцией.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Ревертирование и амплификация проводятся в одной пробирке.

7.1. Подготовка проб к амплификации:

В зависимости от вида фасовки ПЦР-смесь-SC2 см. п.7.1.1. или 7.1.2.

7.1.1. ПЦР-смесь-SC2 мастер-микс, расфасованная в пробирки объемом 2 мл

- 1) Извлечь набор из холодильной камеры, смесь ферментов **Taq+RT** из морозильной камеры. Пробирки с **ПЦР-смесь-SC2** и **Taq+RT** аккуратно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин в течении 2-3 секунд.
- 2) Отобрать необходимое количество пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл по числу анализируемых образцов и контролей, промаркировать и расположить в штативе.
Внимание! При использовании амплификаторов планшетного типа пробирки следует маркировать на стенках или на выступающих частях крышки, не заходя на прозрачную область для считывания флуоресценции. При использовании амплификаторов роторного типа маркировать пробирки на крышке (считывание производится через стенку пробирки).
- 3) Приготовить смесь **ММ-Ф**: для N реакций смешать 10*N мкл **ПЦР-смесь-SC2** и 5*N мкл **Taq+RT**.

*Например, для анализа 24 образцов необходимо 240 мкл **ПЦР-смесь-SC2** и 120 мкл **Taq+RT**.*

*Пробирка с **ПЦР-смесь-SC2** содержит смесь для 100 реакций + объём на 2 дополнительные реакции. Если требуется проанализировать 100 образцов, то нужно внести в пробирку с **ПЦР-смесь-SC2** 510 мкл **Taq+RT**.*

Внимание! Смесь **ММ-Ф** подлежит хранению не более часа при +2...+8 °C.

- 4) В подготовленные пробирки для ПЦР внести по 15 мкл смеси **ММ-Ф**.
- 5) В пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и **ОКО**. Для каждого образца использовать отдельный наконечник.

- 6) Извлечь пробирки с лиофилизированным ПКО и Водой без нуклеаз из холодильной камеры (+2...+8 °C). Содержимое пробирки с ПКО позиционировать на дно коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин. Пробирку с водой без нуклеаз вортиксировать в течение 1-2 секунд, сбросить капли коротким центрифугированием в течение 2-3 секунд при 1,5-2,4 тыс. об/мин. Добавить в пробирку с ПКО 50 мкл Воды без нуклеаз, тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием в течение 2-3 секунд при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

После использования ПКО поместить на хранение при -18...-30 °C или утилизировать согласно п.11.

Примечание: В случае повторного использования восстановленного ПКО: извлечь пробирку с ПКО из морозильной камеры (-18...-30 °C), тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин в течении 2-3 секунд.

- 7) В пробирку, маркированную К+, внести 10 мкл ПКО.
- 8) Плотнo закрыть пробирки, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

7.1.2. ПЦР-смесь-SC2, расфасованная в отдельные ПЦР-пробирки по 10 мкл

- 1) Извлечь набор из холодильной камеры, смесь ферментов Taq+RT из морозильной камеры. Пробирку с Taq+RT аккуратно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин в течении 2-3 секунд.
- 2) Отобрать необходимое количество пробирок ПЦР-смесь-SC2 по числу анализируемых образцов и по одной пробирке для контролей К- и К+, промаркировать, расположить в штативе.
- 3) В каждую пробирку с ПЦР-смесь-SC2 внести по 5 мкл Taq+RT, не задевая слой парафина.
- 4) Внести по 10 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и ОКО.
- 5) Извлечь пробирки с ПКО и Водой без нуклеаз из холодильной камеры (+2...+8 °C), восстановить ПКО (см. п. 7.1.1. пп.6).
- 6) В пробирку, маркированную К+, внести 10 мкл ПКО.
- 7) Плотнo закрыть пробирки, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

7.2. Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени

- 1) Поместить пробирки в амплификатор.

2) Запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации «Интифика» с реакцией обратной транскрипции. Подробную информацию см. в «Методических рекомендациях по применению наборов реагентов серии «Интифика» с использованием различных детектирующих амплификаторов» (<https://forpcr.ru/info/>).

Цикл	Температура, °C	Измерение флуоресценции	Время*	Количество циклов
1	50	-	15 мин	1
2	94	-	3 мин	1
3	94	-	10 с	50
	60	ROX/ Orange HEX/ Yellow Cy5/ Red FAM/ Green	20 с	
* - для некоторых амплификаторов время может быть увеличено в связи с ограничением минимальной продолжительности стадии				

3) Запрограммировать расположение образцов в приборе.

4) Указать каналы детекции FAM, ROX, HEX и Cy5 (при одновременном использовании других наборов указывается детекция по другим используемым каналам).

5) Выставить объем реакционной смеси 25 мкл.

6) Запустить программу амплификации.

7) По окончании выполнения программы провести анализ результатов.

7.3. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов амплификации производить средствами резидентного программного обеспечения используемого амплификатора в соответствии с пользовательской инструкцией к нему или руководствуясь «Методическими рекомендациями по применению наборов реагентов серии «Интифика» с обратной транскрипцией при использовании различных амплификаторов».

Внимание! Для проведения анализа необходимо использовать значения Cq_{ORF1}, Cq_{ORF8}, Cq_N, Cq_{ПК} и Cq_{БК}, указанные во вкладыше к данной серии набора, а также Cq_{К-}.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если:

- все кривые амплификации имеют выраженную сигмоидальную форму⁵.
- для **К+** определено значение $Cq \leq Cq_{ПК}$ по каналам ROX, HEX и Cy5. Если в **К+** определено значение Cq более $Cq_{ПК}$, учитываются только положительные результаты, отрицательные результаты считаются недостоверными.
- для **К-** значения Cq не определены или значения $Cq > Cq_{ORF1}$ по каналу ROX, $Cq > Cq_{ORF8}$ по каналу HEX, $Cq > Cq_N$ по каналу Cy5, однако есть исключения, см. п. 7.3.4.

⁵ Для устранения «выбросов» необходимо воспользоваться «Методическими рекомендациями по применению наборов реагентов серии «Интифика» с обратной транскрипцией при использовании различных амплификаторов».

7.3.1. Образец считается положительным, т.е. содержащим РНК *SARS-CoV-2*, если по как минимум двум каналам из ROX, HEX и Cy5 определены значения $Cq \leq CqORF1$, $CqORF8$ и CqN , даже если по каналу FAM значение $Cq > CqBK$ или не определяется.

7.3.2. Образец считается отрицательным, т.е. не содержащим РНК *SARS-CoV-2*, если по как минимум двум из каналов ROX, HEX и Cy5 значения $Cq > CqORF1$, $CqORF8$ и CqN , при этом по каналу FAM определено значение $Cq \leq CqBK$, а также в ПКО по каналам ROX, HEX и Cy5 определены $Cq \leq CqPK$.

7.3.3. Результат считается недостоверным, если хотя бы по двум из трёх каналов ROX, HEX и Cy5 значения $Cq > CqORF1$, $CqORF8$ и CqN или не определены и при этом выполняется одно из условий:

- по каналу FAM значение $Cq > CqBK$ или не определено.
- в ПКО по каналам ROX, HEX и Cy5 определены значения $Cq > CqPK$ или не определены.

7.3.4. При выявлении контаминации в К- программа определяет $Cq \leq CqORF1$, $CqORF8$ и CqN по каналам ROX, HEX и Cy5, соответственно, необходимо предпринять меры по локализации и ликвидации источника контаминации. Для образцов с недостоверными результатами данной постановки необходимо повторить анализ, начиная с этапа экстракции РНК.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

На основании данных ускоренного хранения набора реагентов установлен срок годности 9 месяцев.

Данные срока годности набора не подтверждены исследованиями в реальном времени.

8.1. Компоненты набора «Интифика *SARS-CoV-2*», кроме смеси ферментов **Taq+RT** должны храниться в упаковке предприятия изготовителя при температуре $+2...+8$ °C в течение всего срока годности.

Смесь ферментов **Taq+RT** требует хранения при $-18...-30$ °C.

8.2. Допускается хранение набора при температуре до $+25$ °C не более 5 суток.

8.3. После вскрытия все компоненты, кроме **Taq+RT**, хранить при $+2...+8$ °C в течение всего срока годности набора. Смесь ферментов **Taq+RT** после вскрытия хранить при $-18...-30$ °C.

8.4. Хранение изделий при температуре $+2...+8$ °C должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

8.5. 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.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

9.1. Транспортировку наборов следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре не выше +8 °С не более 10 суток. Транспортирование изделий должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов. Допускается краткосрочная (до 5 суток) транспортировка при температуре не выше +25 °С.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Гарантийный срок годности набора 9 месяцев со дня приемки изделия отделом технологического контроля. Набор не подлежит ремонту и обслуживанию.

11. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

11.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

11.2. При утилизации отходов необходимо руководствоваться требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и СП 1.3.2322-08.

11.3. Класс опасности отходов при применении - Б (эпидемиологически опасные). Отходы класса Б собираются в твёрдую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) жёлтого цвета или имеющие жёлтую маркировку с надписью «Отходы. Класс Б». Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию. Выбор метода обеззараживания определяется возможностями организации, осуществляющей исследования с применением данного набора в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

11.4. После истечения срока годности пачки и пакеты утилизируются как отходы класса А (эпидемиологически безопасные).

11.5. Компоненты изделия с наличием предупредительных знаков об опасности на упаковке следует уничтожать с соблюдением соответствующих мер безопасности.

11.6. Жидкие компоненты (реагенты, реактивы кроме) уничтожаются раздавливанием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожаются путем сжигания.

Внимание! Неизрасходованные реагенты **Осадитель НК** и **Раствор для отмывки** утилизируются как отходы класса Г и не подлежат сливу в канализацию.

11.7. Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности при проведении того или иного способа уничтожения.

12. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «Интифика *SARS-CoV-2*», следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит.А, тел/факс: (812) 677-87-79.

13. СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ВК	внутренний контроль (эндогенный)
ПКО	комплексный положительный контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
К+	положительный контроль ПЦР
К-	отрицательный контроль экстракции
Cq $ORF1$	граничные значения для Cq (канал ROX) при амплификации мишени гена <i>ORF1ab</i> (<i>SARS-CoV-2</i>); указываются во вкладыше к данной серии набора
Cq $ORF8$	граничные значения для Cq (канал HEX) при амплификации мишени гена <i>ORF8</i> (<i>SARS-CoV-2</i>); указываются во вкладыше к данной серии набора
Cq N	граничные значения для Cq (канал Cy5) при амплификации мишени гена <i>N</i> (<i>SARS-CoV-2</i>); указываются во вкладыше к данной серии набора
CqПК	граничные значения для Cq при амплификации ПКО (каналы HEX, ROX и Cy5), указываются во вкладыше к данной серии набора
CqВК	граничные значения для Cq при амплификации эндогенного ВК (канал FAM), указываются во вкладыше к данной серии набора
CqК-	значения для Cq при амплификации К- (каналы ROX, HEX и Cy5) – определяется при наличии контаминации

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

	Только для <i>in vitro</i> диагностики		Количество тестов
	Номер по каталогу		Ознакомьтесь с инструкцией
	Номер серии		Срок годности
	Производитель		Хранить при
	Дата изготовления		Хранить в защищенном от света месте
	Внимание! Ознакомьтесь с инструкцией		Беречь от влаги
	Опасно! Легковоспламеняющаяся жидкость!		

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 21 (двадцать один) лист

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Д.Г. Полынцев

