

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-mono**», серия E001

Интифика *SARS-CoV-2-mono***Форма 1****кат. № 467-01****Интифика *SARS-CoV-2-mono*****Форма 2****кат. № 467-02**

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор «Интифика SARS-CoV-2-моно» 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.

1.2. Показания к применению.

Набор реагентов «Интифика SARS-CoV-2-моно» 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.

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 21.20.23-543-98539446-2020.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ВК	Внутренний контроль (эндогенный)
ПКО	Комплексный положительный контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец
К+	Реакция с ПКО. Положительный контроль ПЦР
К-	Реакция с ОКО после экстракции НК. Отрицательный контроль экстракции
CqSC2	Пороговое значение Cq по каналу HEX при амплификации фрагмента генома вируса SARS-CoV-2; указывается во вкладыше к данной серии набора
CqПК	Пороговое значение Cq по каналу HEX положительного контрольного образца; указывается во вкладыше к данной серии набора
CqВК	Пороговое значение Cq по каналу FAM эндогенного ВК; указываются во вкладыше к данной серии набора

2.1. Состав набора

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

Набор выпускается в двух вариантах исполнения:

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

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	Состав	Фасовка
Форма 1	<u>Набор реагентов для ОТ-ПЦР</u> 1. Mono-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. Mono-SC2 2. Ферменты (Taq + RT)	1 шт. 1 пробирка (1020 мкл) или 100 отдельных ПЦР-пробирок (по 10 мкл)

Вариант исполнения	Состав	Фасовка
	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 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)

Все реагенты за исключением ПКО в составе набора готовы к применению.

Лиофилизированный ПКО перед первым использованием необходимо восстановить. (см. п. 7.1.1). Вода без нуклеаз для восстановления лиофилизированного ПКО входит в состав набора.

Набор рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные реакции:

- Положительный контроль К⁺ – реакция с ПКО, позволяет оценить прохождение этапов ревертирования и ПЦР. ПКО входит в состав набора и содержит синтезированную выявляемую последовательность РНК вируса.
- Отрицательный контроль К⁻ – реакция с ОКО после экстракции НК позволяет оценить присутствие контаминации в ПЦР-исследовании и исключить ложноположительные результаты. ОКО входит в состав набора и не содержит специфической НК.

Контрольные реакции должны быть включены в каждое ПЦР-исследование.

Внутренний контроль.

В состав реакционной смеси входят олигонуклеотиды для одновременной амплификации 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 реакции обратной транскрипции и амплификации.

Матричная РНК, выбранная в качестве мишени для внутреннего контроля реакций, всегда присутствует в образце в количестве, эквивалентном количеству клеток в мазке. Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет оценить правильность взятия биоматериала и его хранения. Недостаточное количество эпителиальных клеток в мазке приводит к заниженным значениям C_q по каналу FAM.

Во вкладыше к набору указаны пороговые значения C_q^1 для пробы РНК и контрольных реакций: C_qSC2 , $C_qПК$ и C_qBK^2 , что позволяет оценить достоверность результатов ПЦР-исследования.

Допустимые значения пороговых циклов: $C_qSC2 \leq 45$; $C_qПК \leq 35$; $C_qBK \leq 35$. 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-mono*» основан на методе ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, объединенной с реакцией обратной транскрипции, для выявления специфического участка-мишени РНК-генома коронавируса *SARS-CoV-2*.

В начале реакции выделенная РНК обратно транскрибируется в кодирующую ДНК (кДНК). В дальнейшем процессе амплификации специфических фрагментов кДНК, происходит расщепление специфических зондов и накопление флуоресценции, которое детектируется оптической системой амплификатора на соответствующих каналах считывания сигналов в режиме реального времени. После завершения реакции на основании полученных данных происходит оценка графиков накопления флуоресценции и расчет значений C_q , соответствующих характеристическим точкам графика.

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

¹ C_q - общее обозначение цикла амплификации, соответствующего характеристической точке графика флуоресценции (соответствует C_t , C_p).

² Пороговые значения C_q при амплификации фрагмента кДНК, синтезированной на матрице РНК вируса *SARS-CoV-2*, а также ПКО и эндогенного ВК, соответственно.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность при выделении РНК из мазков из носоглотки и/или ротоглотки составляет 500 ГЭ³/мл SARS-CoV-2 в образце⁴.

3.2. Аналитическая специфичность

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

Способность набора специфически определять РНК SARS-CoV-2 в присутствии РНК нижеперечисленных микроорганизмов достигнута путем подбора праймеров и зонда к высокоспецифичному фрагменту 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.

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)*, *Parainfluenza virus 1-4*, *Influenza virus 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-моно», серия E001 было проведено исследование 110 образцов клинического материала, включая:

56 – мазки из ротоглотки;

54 – мазки из носоглотки.

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-моно» (объем элюции 100 мкл), а также наборов для экстракции НК, рекомендуемых ООО «Компания Алкор Био».

Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 95 % составила 94,9 % (суммарно, для препаратов НК из всех исследованных клинических образцов). Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности – 94,4 %.

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	РНК SARS-CoV-2	91,06-100%	89,12-100%
Мазки из носоглотки		89,12-100%	89,12-100%

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.

Все образцы, полученные для лабораторного исследования, следует считать потенциально инфицированными, и при работе с ними должны учитываться требования СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».

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 клинично-диагностических лабораториях, относятся к классу Б (эпидемиологически 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 Mono-SC2, Ферментов (Taq+RT) и ОКО 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, HEX;
- 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 варианта исполнения «Форма 2» дополнительно потребуются:

- 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.

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», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» и Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (Covid-19)», утвержденным Минздравом России 03.09.2020 (версия 8).

На сопровождающем формуляре необходимо указать наименование подозреваемой ОРИ, предварительно уведомив лабораторию о том, какой образец транспортируется. Транспортировка возможна на льду.

Хранение и транспортировку образцов необходимо осуществлять с применением транспортной среды, зарегистрированной в РФ, предназначенной для хранения и транспортировки респираторных мазков с целью проведения молекулярно-генетических исследований. Транспортные среды, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био»: «Транспортная среда для биопроб СТОН-Ф» (РЗН 2020/9640 от 14.02.2020), Реагент для транспортировки и хранения клинического материала "Транспортная среда с муколитиком (ТСМ) (ФСР 2009/05514 от 13.03.2019).

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 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. Взятие клинического материала

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 транспортной средой, 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 транспортной средой. Конец зонда отломить с расчётом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с транспортной средой 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.

6.2. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Наличие интерферирующих веществ в образцах биологического материала (слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты) может быть причиной ингибирования ПЦР и получения сомнительных результатов. Для получения достоверной клинической картины необходимо информировать пациентов о правилах подготовки к ПЦР-исследованию и соблюдать правила взятия биологического материала (см. п.6.1.1.). Для экстракции НК использовать наборы реагентов, прошедшие экспертизу качества, допущенные к обращению на территории РФ, предназначенные для работы с мазками из носоглотки и/или ротоглотки, гарантирующие получение на выходе высокоочищенной НК.

Оценка влияния интерферирующих веществ на эффективность ПЦР с использованием набора «Интифика SARS-CoV-2-моно» 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, зарегистрированные в РФ и предназначенные для экстракции РНК из данного вида биоматериала.

Наборы для экстракции РНК, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био»: «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) (ФСР 2010/08867 от 13.10.2019), Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала "РИБО-сорб" (ФСР 2008/03993 от 22.02.2019), Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (РеалБест экстракция 100) (РЗН 2014/1423 от 25.03.2017). 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 1,3 тыс. 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). Если осадок сформировался неплотно, то для таких проб рекомендовано повторить этап центрифугирования.

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. В процессе инкубации необходимо тщательно перемешивать содержимое пробирок на вортексе через каждые 2 минуты в течение 5-7 секунд. Если у термостата предусмотрена функция шейкирования, вортексирование не требуется, достаточно выставить скорость вращения 1300 об/мин.

Примечание:

1. Допустимо при необходимости увеличить объем 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 компонента Mono-SC2 см. п.7.1.1. или 7.1.2.

7.1.1. ПЦР смесь «Mono-SC2», расфасованная в пробирки объемом 2 мл

- 1) Извлечь набор из холодильной камеры, смесь ферментов Taq+RT из морозильной камеры. Пробирки с Mono-SC2 и Taq+RT аккуратно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин в течение 2-3 секунд.
- 2) Отобрать необходимое количество пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл по числу анализируемых образцов, одного положительного контрольного образца и одного отрицательного контрольного образца, 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 MM-F:
для N реакций смешать $10 \cdot N$ мкл Mono-SC2 и $5 \cdot N$ мкл Taq+RT.
Например, для анализа 24 образцов необходимо 240 мкл Mono-SC2 и 120 мкл Taq+RT.
Пробирка с Mono-SC2 содержит смесь для 100 реакций + объём на 2 дополнительные реакции. Если требуется проанализировать 100 образцов, то нужно внести в пробирку с Mono-SC2 510 мкл Taq+RT.
Внимание! Смесь MM-F подлежит хранению не более часа при +2...+8 °C.
- 4) В подготовленные пробирки для ПЦР внести по 15 мкл смеси MM-F.
- 5) В пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов. Для каждого образца использовать отдельный наконечник.
- 6) В пробирку, маркированную К-, внести 10 мкл ОКО, полученного в результате экстракции.
- 7) 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. Содержимое пробирки с водой без нуклеаз перемешать на вортексе 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. --
- 8) В пробирку, маркированную К+, внести 10 мкл ПКО.
- 9) Плотно закрыть ПЦР пробирки, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

- 10) После использования ПКО поместить на хранение при $-18...-30^{\circ}\text{C}$ или утилизировать согласно п.11.

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

Примечание: При наличии пузырей убрать их постукиванием пальцем по стенке пробирки.

7.1.2. ПЦР смесь «Mono-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 Mono-SC2 по числу анализируемых образцов, промаркировать, расположить в штативе.
- 3) Отобрать одну пробирку Mono-SC2 для проведения положительного контроля, промаркировать К+ и расположить в штативе.
- 4) Отобрать одну пробирку Mono-SC2 для проведения отрицательного контроля экстракции, промаркировать К- и расположить в штативе.
- 5) В каждую пробирку с Mono-SC2 внести по 5 мкл Taq+RT, не задевая слой парафина.
- 6) Внести по 10 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
- 7) В пробирку, маркированную К-, внести 10 мкл ОКО, полученного в результате экстракции.
- 8) Извлечь пробирки с ПКО и Водой без нуклеаз из холодильной камеры ($+2...+8^{\circ}\text{C}$). Восстановить ПКО: 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.
- 9) В пробирку, маркированную К+, внести 10 мкл восстановленного ПКО.
- 10) После использования ПКО поместить на хранение при $-18...-30^{\circ}\text{C}$ или утилизировать согласно п.11.

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

- 11) Плотнo закрыть все ПЦР пробирки, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин.

Примечание: При наличии пузырей убрать их постукиванием пальцем по стенке пробирки.

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 (900 с)	1
2	94	-	3 мин (180 с)	1
3	94	-	10 с	5
	60	-	20 с	
4	94	-	10 с	45
	60	HEX/ Yellow 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, HEX (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 и руководствуясь «Методическими рекомендациями по применению наборов реагентов серии «Интифика» с обратной транскрипцией при использовании различных амплификаторов».

Внимание! Для проведения анализа необходимо использовать значения CqSC2, CqПК и CqВК, указанные во вкладыше к данной серии набора, а также CqК.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если:

- все кривые амплификации имеют выраженную S-образную форму⁵.

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

- для К+ определено значение $Cq \leq Cq_{ПК}$ по каналу HEX. Если в К+ определено значение Cq более $Cq_{ПК}$, учитываются только положительные результаты, отрицательные результаты считаются недостоверными.
- для К- значение Cq не определено или значение $Cq > Cq_{SC2}$ по каналу HEX, однако есть исключения, см. п. 7.3.4.

7.3.1. Образец считается положительным, т.е. содержащим РНК SARS-CoV-2, если по каналу HEX определено значение $Cq \leq Cq_{SC2}$, даже если по каналу FAM значение $Cq > Cq_{BK}$ или не определяется.

7.3.2. Образец считается отрицательным, т.е. не содержащим РНК SARS-CoV-2, если по каналу HEX значение $Cq > Cq_{SC2}$, при этом по каналу FAM определено значение $Cq \leq Cq_{BK}$, а также в ПКО по каналу HEX определено $Cq \leq Cq_{ПК}$.

7.3.3. Результат считается недостоверным, если по каналу HEX значение $Cq > Cq_{SC2}$ или не определено и при этом выполняется одно из условий:

- по каналу FAM значение $Cq > Cq_{BK}$ или не определено.
- в ПКО по каналу HEX определено значение $Cq > Cq_{ПК}$ или не определено.

7.3.4. При выявлении контаминации в К- программа определяет $Cq \leq Cq_{SC2}$ каналу HEX, необходимо предпринять меры по локализации и ликвидации источника контаминации. При этом, все положительные результаты со значениями $Cq(HEX) \geq (Cq_{К-}(HEX) - 5)$ считаются недостоверными, а все остальные результаты учитываются. 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 15 месяцев.

Данные срока годности набора не подтверждены исследованиями в реальном времени.

8.1. Компоненты набора «Интифика SARS-CoV-2-моно», кроме смеси ферментов Taq+RT должны храниться в упаковке предприятия изготовителя при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

Смесь ферментов Taq+RT требует хранения при $-18...-30^{\circ}\text{C}$.

8.2. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

8.3. После вскрытия все компоненты, кроме Taq+RT, хранить при $+2...+8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора. Смесь ферментов Taq+RT после вскрытия хранить при $-18...-30^{\circ}\text{C}$.

8.4. Хранение изделий при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ 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 15 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-моно», 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.

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ



Только для *in vitro*
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 (марка одна) лист

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Д.Г. Польшцев

