

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

АО «ГЕНЕРИУМ»

Д.А. Кудлай

« 10 »

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«Набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин»»
по ТУ 21.20.23-069-26329720-2020

НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «ИзоTERM SARS-CoV-2 РНК-скрин»» по ТУ 21.20.23-069-26329720-2020 (далее по тексту – *набор реагентов*), предназначен для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в образцах, полученных из назальных и/или назофарингеальных мазков, или раствора бронхоальвеолярного лаважа (далее по тексту – анализируемые образцы), методом петлевой изотермальной амплификации.

Функциональное назначение: вспомогательное средство в диагностике *in vitro* (выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2).

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Набор реагентов используется для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 у лиц с симптомами ОРВИ и контактировавшими с заболевшим COVID-19, не зависимо от их возраста, лицам всех возрастов без признаков ОРВИ (в очагах инфекции/ в условиях распространения инфекции) с целью раннего выявления коронавируса для предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

Сокращенное наименование медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«ИзоTERM SARS-CoV-2 РНК-скрин»

ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Только для профессионального использования.

Сотрудники клиничко-диагностических лабораторий медицинских учреждений.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1 Состав набора реагентов

Набор реагентов предназначен для ручной постановки анализа.

Т а б л и ц а 1 - Комплектность набора реагентов

Наименование	Количество
<i>Компоненты</i>	
«К+» – положительный контроль, прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: 0,1 % проклин 300	1 пробирка (100 мкл)
«К-» – отрицательный контроль – прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: 0,1 % проклин 300	1 пробирка (100 мкл)
«РС» – реакционная смесь – прозрачная бесцветная жидкость, при хранении может приобретать цвет от желтого до коричневого, что не влияет на качество. Консерванты: 0,1 % проклин 300	1 пробирка (1,5 мл)
«Фермент» – Bst-полимераза – прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: 0,1 % проклин 300	1 пробирка (130 мкл)
«Лизирующий буфер» - прозрачная бесцветная жидкость. Консервант: 0,1 % проклин 300	1 флакон (12,0 мл)
Планшет 96-луночный для проведения ПЦР	1 шт.
Пленка для запаивания планшета 96-луночного	1 шт.
<i>Эксплуатационная документация</i>	
Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.

Примечание

Паспорт на серию входит в комплект поставки набора реагентов. Число экземпляров паспорта каждой серии, определено в договоре на поставку продукции.

2 Число анализируемых образцов биологического материала

Набор реагентов предназначен для выполнения 96 определений, включая контрольные образцы.

3 Принцип метода

Для определения наличия или отсутствия инфекционных агентов в биологических жидкостях человека проводят амплификацию генетического материала возбудителя инфекции. Помимо широко распространенного метода амплификации нуклеиновых кислот полимеразной цепной реакцией на сегодняшний день применяется петлевая изотермальная амплификация. В основе данной методики лежит реакция синтеза нуклеиновых кислот с вытеснением цепи, катализируемая Bst-полимеразой из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*.

Отличительными особенностями петлевой изотермальной амплификации является проведение реакции при постоянной температуре 60 – 65 °С, быстрое накопление продуктов реакции (15 – 60 мин), возможность совмещения реакции с обратной транскрипцией (оба процесса осуществляется одним ферментом, Bst-полимеразой), низкой чувствительностью к примесям, возможность использования в качестве исходной матрицы кровь или другие биологические жидкости.

Выявление наличия или отсутствия РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологических жидкостях человека включает в себя две стадии: экстракцию РНК коронавируса SARS-CoV-2 из анализируемых образцов и петлевую изотермальную амплификацию, с использованием специфических олигонуклеотидных последовательностей и модифицированной Bst-полимеразы из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*.

Для контроля анализа в наборе реагентов предусмотрены контрольные образцы: «К+» и «К-».

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Контрольные образцы «К+» и «К-» используются для контроля проведения реакции петлевой изотермальной амплификации при исследовании на выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 в анализируемых образцах.

«К-» (Отрицательный контроль), представляет собой раствор, НЕ содержащий плазмидную ДНК со вставкой фрагмента РНК коронавируса SARS-CoV-2.

«К+» (Положительный контроль), представляет собой раствор, содержащий плазмидную ДНК со вставкой фрагмента РНК коронавируса SARS-CoV-2 в концентрации не менее 10 000 копий РНК коронавируса SARS-CoV-2 на 1 мл образца.

«РС» (Реакционная смесь), представляет собой смесь специфических олигонуклеотидных последовательностей в необходимом для проведения реакции буферном растворе.

«Фермент» (Bst-полимераза), представляет собой раствор фермента Bst-полимеразы в необходимом для проведения реакции буферном растворе.

«Лизирующий буфер», представляет собой буферный раствор для лизирования вирусных частиц и эпителиальных клеток в анализируемом образце.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1 Чувствительность

Чувствительность набора реагентов определяли с использованием рабочей панели образцов «РП РНК(+/-)SARS-CoV-2», содержащих плазмидную ДНК со вставкой фрагмента РНК коронавируса SARS-CoV-2 (далее по тексту – рабочая панель образцов), аттестованной отделом биологического и технологического контроля (далее по тексту – ОБТК), ООО «Медико-биологический Союз». Чувствительность набора реагентов с образцами рабочей панели без ложноотрицательных результатов должна быть не менее 100 %.

2 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора реагентов определяли с использованием рабочей панели образцов, аттестованной ОБТК ООО «Медико-биологический Союз».

Предел обнаружения набора реагентов составляет 1000 копий РНК коронавируса SARS-CoV-2 на 1 мл образца при выделении РНК с использованием компонента набора реагентов «Лизирующий буфер» и при выделении РНК вируса SARS-CoV-2 с использованием «ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС», производства ООО «НПО ДНК-Технология» (см. раздел «Подготовка анализируемых образцов»).

3 Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 определяли в ходе клинико-лабораторных испытаний на 125 положительных образцах, показана 100 % чувствительность (97,6%, интервал (95,3-100,0) %, с доверительной вероятностью 95%).

4 Специфичность

Специфичность набора реагентов определяли с использованием рабочей панели образцов, аттестованной ОБТК ООО «Медико-биологический Союз». Специфичность набора реагентов с образцами рабочей панели без ложноположительных результатов должна быть не менее 100 %.

5 Диагностическая специфичность

Диагностическую специфичность выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 определяли в ходе клинико-лабораторных испытаний на 125 отрицательных образцах, показана 100 % специфичность (97,6%, интервал (95,3-100,0) %, с доверительной вероятностью 95%).

6 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов проверялась *in silico* со следующими инфекционными агентами:

Коронавирус 229E	Риновирус
Коронавирус OC43	Паразховирус
Коронавирус HKU1	<i>Candida albicans</i>
Коронавирус NL63	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
SARS-коронавирус	<i>Legionella</i> (non-pneumophila)
MERS-коронавирус	<i>Bacillus anthracis</i> (Anthrax)
Аденовирус	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Метапневмовирус человека	<i>Neisseria elongata</i> and <i>Neisseria meningitidis</i>
Парагрипп первого типа	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Парагрипп второго типа	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Парагрипп третьего типа	<i>Streptococcus salivarius</i>
Парагрипп четвертого типа	<i>Leptospira</i> sp.
Грипп типа А	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
Грипп типа В	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Грипп типа С	<i>Coxiella burnetii</i> (Q-Fever)
Энтеровирус	<i>Staphylococcus aureus</i>
Респираторный синцитиальный вирус типа А	<i>Haemophilus influenzae</i>
Респираторный синцитиальный вирус типа В	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Для анализа использовали он-лайн доступные ресурсы: BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Среди протестированных организмов, только для SARS-коронавируса показана гомология с фрагментом последовательности участка SARS-CoV-2, которая составляет 82%. С такой степенью гомологии невысока вероятность получения какого-либо значимого сигнала в представленной диагностической системе.

Для всех других проанализированных микроорганизмов гомологии не обнаружено.

Аналитическая специфичность набора реагентов проверялась *in vitro* на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» на охарактеризованных музейных штаммах с биологической активностью не менее $1,0 \times 10^5$ УЕ·мл⁻¹: *Streptococcus pneumoniae* штаммы ATCC 49619 и № 101, *Haemophilus influenzae* type B штамм № 3689, *Legionella pneumophila* штамм ATCC 33152, *Metapneumovirus*

штамм НМ-1, *Rhinovirus* штаммы JH2060 и штамм 6669 (тип 39), *Human respirovirus 1* штамм С-39, Коронавирус штаммы «ОС-43» (256) и «Р/Ленинград/2/77», Коронавирус КРС штамм «КВ-90».

Аналитическая специфичность набора реагентов проверялась *in vitro* на базе ООО «МБС-Технология» на: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, вирус парагриппа, вирус гриппа А, Аденовирус, Вирус гриппа В, Метапневмовирус, Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), Риновирус, *Legionella pneumophila*.

Проведенные анализы *in silico* и *in vitro* указывают на то, что неспецифическая амплификация, которая могла бы привести к перекрестной реакции или повлиять на амплификацию целевого участка SARS-CoV-2, крайне маловероятна.

7 Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием двенадцати положительных образцов и трех отрицательных образцов, полученных из назальных, назофарингеальных мазков и раствора бронхоальвеолярного лаважа в 5 повторах на наборах реагентов одной серии. Коэффициент вариации не превысил 10 %.

Межсерийная воспроизводимость анализа была протестирована в ходе клинико-лабораторных испытаний с использованием двенадцати положительных образцов и трех отрицательных образцов, полученных из назальных, назофарингеальных мазков и бронхоальвеолярного лаважа на 2 сериях набора реагентов. Коэффициент вариации не превысил 10 %.

8 Интерферирующие вещества

Наличие муцина (до 5 % по объёму) или цельной крови (до 5 % по объёму) или хлоргексидина (0,5 % в образце) в назальных и/или назофарингеальных мазках и/или растворе бронхоальвеолярного лаважа не влияет на результат анализа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 3 в соответствии с Приказом МЗ РФ №4н от 06.06.2012 г. «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».

При работе с набором реагентов соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.). Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению РНК SARS-CoV-2, обязаны обеспечивать безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

При работе необходимо выполнять следующие требования:

- рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные;
- при удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов;
- применять набор реагентов строго по назначению, согласно данной инструкции;
- допускать к работе с набором реагентов только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики;
- не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

Компоненты набора «К+», «К-», «Фермент», «РС» и «Лизирующий раствор» содержат в качестве консерванта 0,1 % проклина 300.

Гуанидин гидрохлорид, входящий в состав «Лизирующего буфера», обладает раздражающим действием. Следует избегать разбрызгивания и попадания его на кожу и слизистые.

Все реактивы, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях, являются нетоксичными. При попадании данных растворов на кожу и слизистые промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты (блузон, брюки, халат, шапочку, тапочки или сабо, очки защитные, полумаску, одноразовые перчатки, нарукавники одноразовые).

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочие поверхности дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения». Материалы, подлежащие обеззараживанию, подвергать обработке дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ. Инструменты и оборудование, а также поверхности, на которых проводился анализ, обработать дезсредствами, разрешенными для применения на территории РФ, например, раствором этилового спирта (ГОСТ Р 51652) с объемной долей 70 % в течение 10 секунд.

Обеззараживание и/или обезвреживание и утилизацию всех анализируемых образцов, компонентов и отходов набора реагентов, несущих потенциальную биологическую опасность, производить в соответствии с разделом «Утилизация набора реагентов» настоящей инструкции по применению.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором реагентов необходимо нижеперечисленное оборудование:

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени планшетного типа (далее по тексту - амплификатор): «CFX96» («Bio-Rad», США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия); «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «Rotor Gene» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия);
- бокс абактериальной воздушной среды 2-го класса биологической защиты или ПЦР-бокс;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 25 °С до 98 °С;
- холодильник, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С, и холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру до минус 20 °С;
- таймер/часы;
- одноканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,5 до 200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %;
- многоканальные полуавтоматические дозаторы пипеточные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,5 до 200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов, погрешность измерения которых должна быть не более 3 %; (при наличии);
- центрифуга лабораторная типа Vortex (далее по тексту – вортекс);
- микроцентрифуга лабораторная для пробирок типа эппендорф (при наличии);
- микроцентрифуга лабораторная для ПЦР-планшета (при наличии).

Для работы с набором реагентов необходимы следующие материалы:

- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером (фильтром) для полуавтоматических одноканальных дозаторов;
- одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов пипеточных;
- пробирки стерильные одноразовые полипропиленовые (типа эппендорф) вместимостью 1,5 – 2,0 мл;
- пробирки стерильные одноразовые полипропиленовые (типа эппендорф) вместимостью 0,2 мл (при необходимости);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные;

- нарукавники одноразовые;
- контейнер для сбора и обеззараживания наконечников;
- штатив для пробирок;
- крио штативы для микропробирок (при наличии);
- ледяная баня или источник льда;
- пробирки и пластик для амплификатора типа «Rotor Gene»;
- «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в двух формах комплектации: комплект ПРОБА-НК и комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Рег. удостоверение № ФСР 2010/08867 (при необходимости).

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Идентификацию и прослеживаемость проб пациента (назальные, назофарингеальные мазки слизистой верхних дыхательных путей или раствор бронхоальвеолярного лаважа) проводить в соответствии с системой менеджмента качества лаборатории.

Взятие, хранение и транспортирование анализируемых образцов 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 «Временным методическим рекомендациям по лабораторной диагностике нового коронавируса 2019 (2019-nCoV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

Перед постановкой анализа анализируемые образцы, хранившиеся в морозильной камере необходимо разморозить. Все образцы перед внесением в «Лизирующий буфер» необходимо аккуратно перемешать.

Не допускается повторное замораживание/оттаивание образцов.

ПРИЧИНЫ СНИЖЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Использование компонентов набора реагентов с истекшим сроком годности.

Использование компонентов из наборов реагентов разных серий или смешивание их в процессе приготовления растворов.

Использование компонентов из наборов реагентов других производителей.

Несоблюдение условий и сроков хранения невскрытых компонентов набора реагентов.

Несоблюдение условий и сроков хранения вскрытых компонентов набора реагентов.

Неправильное дозирование растворов, которое приводит как к росту, так и к снижению регистрируемой флуоресценции.

Изменение концентрации раствора за счет испарения жидкости из открытого флакона с компонентом.

Недостаточное перемешивание компонентов набора реагентов.

Использование для работы с компонентами, анализируемыми и контрольными образцами грязных наконечников.

Неправильная утилизация пцр-плашек и/или пробирок после проведения реакции может приводить к контаминации лаборатории и, как следствие, получению ложно-положительных результатов в дальнейших постановках.

Недостаточно быстрое и/или недостаточное охлаждение образцов после выделения и перед внесением в ПЦР-смесь может приводить к неспецифической амплификации и, как следствие, получению ложно-положительных результатов.

Использование для дезинфекции посуды, оборудования, материалов и рабочих поверхностей неразрешенных и/или оказывающих влияния на результат изотермальной петлевой амплификации дезсредств. Рекомендуются использовать, например, хлорамин и другие хлорсодержащие средства.

Рекомендуется использовать перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные и нарукавники одноразовые.

Проведение анализа в неблагоприятных условиях окружающей среды, например, при температуре воздуха, в лаборатории выше 25 °С и относительной влажности воздуха более 70 %.

ПОДГОТОВКА ОБОРУДОВАНИЯ

Для проведения анализа с помощью набора реагентов с использованием амплификатора, необходимо его подготовить **заранее** в соответствии с руководством по эксплуатации.

Внимание! Если в амплификаторе предусмотрен дополнительный нагрев крышки, то ее необходимо нагреть заранее.

ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с набором реагентов и анализируемыми образцами необходимо использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для манипуляций с набором реагентов и анализируемыми образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером

Из анализируемых образцов необходимо выделить РНК.

Для выделения РНК из анализируемых образцов, у которых от времени забора до проведения анализа прошло не более 48 часов, можно использовать компонент набора реагентов «Лизирующий буфер» (метод выделения 1, см. ниже). Для всех остальных анализируемых образцов для выделения РНК, необходимо использовать метод 2.

Внимание! Если **неизвестны** условия транспортирования и хранения анализируемых образцов, то выделение РНК из таких образцов необходимо проводить по методу 2, учитывая, что результаты анализа могут быть ложноотрицательными, если условия транспортирования и/или хранения были нарушены.

Метод 1

Выделение РНК с использованием компонента набора реагентов «Лизирующий буфер»
«Лизирующий буфер» перед использованием достать из коробки, проверить целостность упаковки и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.

Затем в пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2,0 мл вносят сначала 100 мкл «Лизирующего буфера», затем вносят 25 мкл анализируемого образца и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 2-5 секунд каждую пробирку. Пробирки инкубируют в термостате твердотельном при температуре 70 °С в течение 20 минут.

После инкубации пробирки с образцами необходимо быстро охладить, **НО НЕ ЗАМОРОЗИТЬ**, для этого их нужно из термостата переставить в замороженный в морозильной камере (от минус 16 до минус 20°С) пластиковый или металлический штатив и поставить в холодильник (от 2 до 8 °С). Хранить выделенные образцы не более 20 минут (например, в холодильнике, ледяной бане, крио-штативе). После этого каждую пробирку интенсивно перемешивают на вортексе в течение 2-5 секунд. И сбросить капли быстрым центрифугированием 2-5 секунд.

Метод 2

Выделение РНК с использованием «ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС», производства ООО «НПО ДНК-Технология»

Процедуру выделения провести в соответствии с инструкцией по применению на медицинское изделие.

ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Подготовка набора реагентов

Вскрыть упаковку с компонентами набора реагентов. Пробирки с компонентами набора реагентов проверить на целостность и срок годности. При обнаружении повреждения или при

истечении срока годности компоненты набора реагентов следует обработать в соответствии с разделом «Утилизация набора реагентов» настоящей инструкции по применению.

Все компоненты набора реагентов готовы к использованию.

Перед применением все компоненты набора реагентов, **кроме «РС» и «Фермент»**, инкубировать при комнатной температуре до достижения комнатной температуры, аккуратно перемешать и осадить капли с крышки пробирки, возможно для этого использование центрифугирования в течение 1-3 секунд.

Хранение: неиспользованные и вскрытые компоненты хранить при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора реагентов. Неиспользованный «РС» хранить в защищенном от света месте, поместив в пакет из комбинированного материала, сразу после приготовления реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Запрещается хранение компонентов «РС» и «Фермент» при комнатной температуре, а также хранение «РС» на свету.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! При работе с набором реагентов и образцами выделенной РНК необходимо использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free. Для манипуляций с реагентами, образцами выделенной РНК и контрольными образцами использовать одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси («РС» и «Фермент») смешивать непосредственно перед проведением анализа

Подготовка планшета 96-луночного	Достать планшет 96-луночный из пакета с zip-lock. Рассчитать количество лунок в соответствии с количеством образцов выделенной РНК и контрольных образцов, исходя из того, что каждый образец выделенной РНК будет анализироваться в одном повторе. Расчет количества лунок производится по формуле: Количество лунок (N) = n + 2, где n – количество образцов выделенной РНК, 2 – «К+» и «К-» При необходимости промаркировать лунки планшета, согласно идентификационному номеру исследуемого образца. Планшет поместить на ледяную баню или хладагент (Внимание! не замораживать) Для возможности одновременной работы двух лаборантов и с целью соблюдения временного интервала 10-15 минут до конца внесения образцов, рекомендуется разделить планшет на 2 части по 48 лунок (при этом отсчитать по 2 лунки для «К+» и «К-»). Дополнительно рекомендуется использовать крио-штативы для того, чтобы реакционная смесь в планшете не нагревалась выше 2-8 °С
---	--

ВНИМАНИЕ! В зависимости от используемого оборудования для проведения анализа надписи на планшете следует располагать таким образом, чтобы они не мешали детектированию флуоресцентного сигнала. См. руководство по эксплуатации амплификатора

Приготовление реакционной смеси	В пробирке вместимостью 1,5 – 2,0 мл для приготовления реакционной смеси смешать холодные! компоненты «РС» и «Фермент», из расчета на необходимое число лунок, согласно приведенной ниже таблице. Перемешать приготовленный раствор на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратким центрифугированием (1-3 с)
--	---

Название компонента	Объем реагента на один образец (без учета контрольных образцов)	Объем реагента для анализа n образцов выделенной РНК с учетом постановки контрольных образцов
«РС»	14 мкл	(N + 1) * 14 мкл
«Фермент»	1 мкл	(N + 1) мкл

Пример: Количество образцов выделенной РНК – 5 шт.

$$N = 5 + 2 = 7.$$

Следовательно, необходимо смешать: $(7 + 1) * 14 \text{ мкл} = 112 \text{ мкл}$ «РС»

и $(7 + 1) = 8 \text{ мкл}$ «Фермент»

Внесение реакционной смеси	В каждую промаркированную лунку 96-луночного планшета (холодного!) внести по 15 мкл холодной! реакционной смеси (или возможно использование микропробирок типа эппендорф вместимостью 0,2 мл с крышкой)
-----------------------------------	---

Внесение образцов в лунки 96-луночного планшета или в пробирки для амплификатора «Rotor Gene»	В каждую промаркированную лунку 96-луночного планшета (или в пробирку для амплификатора «Rotor Gene») внести по 5 мкл подготовленных <i>образцов выделенной РНК</i> , затем в предпоследнюю и последнюю - по 5 мкл контрольных образцов «К+» и «К-», соответственно.
--	--

Внимание! Для каждого образца выделенной РНК и контрольных образцов использовать **новый наконечник** и с помощью него перемешать пипетированием содержимое лунки 3-5 раз. **Не допускать образование пузырей!** Отрезать фрагмент подходящего размера от входящей в набор реагентов пленки для запаивания и **плотно!** наклеить его на промаркированные лунки, используя для этого аппликатор. Пленка приклеивается к краям лунок при надавливании. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить капли со стенок лунок.

Внимание! Очень важно герметично запаивать планшет, чтобы не происходило испарение во время амплификации, во избежание получения ложноположительных результатов, а также избежание контаминации лаборатории.

ВНИМАНИЕ! Планшет с реакционной смесью и образцами выделенной РНК незамедлительно поместить в заранее подготовленный амплификатор и начать проведение анализа!

При невозможности использования крио-штативов допускается внесение готовой реакционной смеси в пробирку с уже внесенным образцом для того, чтобы реакционная смесь не нагревалась выше $2-8^{\circ}\text{C}$ более 20 минут. При этом в каждую пробирку реакционная смесь прибавляется отдельным наконечником с фильтром и с помощью него перемешивается пипетированием содержимое лунки 3-5 раз. **Не допускать образование пузырей!**

Регистрация результатов анализа	Выполнить в соответствии с разделом «Процедурой измерения и оценки результата»
--	--

Процедура измерения и оценка результата

Ввести в амплификатор программу проведения петлевой изотермальной амплификации и детекции флуоресцентных сигналов:

Условия реакции	70 циклов с измерением флуоресценции на канале SYBR (FAM) каждые 30 секунд Температура 65°C
-----------------	---

Для детектирования следует выбирать зеленый канал детекции SYBR (FAM).

Запрограммировать положение лунок с контрольными и образцами выделенной РНК согласно инструкции к прибору.

Поместить планшет с реакционной смесью и образцами выделенной РНК в амплификатор.

Запустить программу и провести петлевую изотермальную амплификацию с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Условия правильности работы набора реагентов

В положительном контроле «К+» прибор должен определять:

– нарастание сигнала флуоресценции в канале SYBR (FAM).

В отрицательном контроле «К-» прибор НЕ должен:

– фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **SYBR (FAM)**.

В анализируемом образце, при наличии РНК коронавируса SARS-CoV-2, прибор должен:

– фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **SYBR (FAM)** и определять значение порогового цикла **Ct** (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) в канале **SYBR (FAM)**.

В анализируемом образце, НЕ содержащем РНК коронавируса SARS-CoV-2, прибор НЕ должен:

– фиксировать нарастание сигнала флуоресценции в канале **SYBR (FAM)** и определять **Ct** в канале **SYBR (FAM)**.

Учет результатов анализа

Для отрицательного контроля «К-»: значение **Ct** в канале **SYBR (FAM)** не должно определяться. Если для «К-» значение **Ct** меньше 50 циклов, это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае результаты по данной постановке считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

Для положительного контроля «К+»: значение **Ct** в канале **SYBR (FAM)** должно быть менее 50 циклов.

Внимание! При внесении реакционной смеси в лунки без анализируемых образцов, в данных лунках могут наблюдаться ложноположительные результаты.

Интерпретация результатов анализа

Если в анализируемом образце значение **Ct** в канале **SYBR (FAM)** не определяется или составляет более 60 циклов, анализируемый образец считать **отрицательным**, то есть не содержащим РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Если в анализируемом образце значение **Ct** в канале **SYBR (FAM)** составляет менее 50 циклов, анализируемый образец считать **положительным**, то есть содержащим РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Анализируемые образцы, у которых значение **Ct** в канале **SYBR (FAM)** от 50 до 60 циклов расценивать как сомнительные.

Решение по сомнительным образцам принимается сотрудниками КДЛ.

ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Для определения наличия или отсутствия РНК коронавируса SARS-CoV-2, рекомендуется использовать назальные и/или назофарингеальные мазки в транспортной среде, или раствор бронхоальвеолярного лаважа, так как РНК коронавируса SARS-CoV-2 может не выявляться в других клинических образцах.

УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

В процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности токсичные отходы не образуются.

Отходы, образующиеся в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности, относить к классу Б.

Набор реагентов с истекшим сроком годности утилизировать как отходы класса Б.

Обращение (сбор, временное хранение, обеззараживание и/или обезвреживание и транспортирование) отходов, образующихся в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности, проводить согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Для обеззараживания и/или обезвреживания отходов в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» использовать зарегистрированные в РФ дезинфицирующие средства и оборудование в соответствии с инструкциями по их применению.

Отходы утилизировать через организации, имеющие лицензию на этот вид деятельности.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора реагентов - 6 месяцев*.

Сроки годности вскрытых компонентов набора реагентов - в течение срока годности набора реагентов.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Набор реагентов хранить в соответствии с СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов» при температуре от 2 до 8 С в течение срока годности.

Транспортирование набора реагентов производить в соответствии с СП 3.3.2.3332-16 при температуре от 2 до 8 С.

Набор реагентов не замораживать.

Примечание: * Данные не подтверждены исследованиями в реальном времени. Исследование стабильности набора реагентов в реальном времени продолжается.

Условия применения набора реагентов:

- температура окружающей среды (15 – 25) °С;
- относительная влажность воздуха (не более 70) %;
- атмосферное давление (84,0 – 106,7) кПа / (630 – 800) мм. рт. ст.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие выпускаемого набора реагентов требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки набора реагентов, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил применения, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить набор реагентов, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления набора реагентов производителем.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, обращаться в АО «ГЕНЕРИУМ» по адресу: 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Заводская, стр. 273.

Тел./ф. +7 (49243)72-5-20, 72-5-14.

Символы, применяемые для маркировки компонентов набора реагентов

Символ	Наименование символа	Символ	Наименование символа
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014			
	Для диагностики in vitro		Код партии
	Содержимого достаточно для 96 тестов		Использовать до
	Не использовать повторно		Температурный диапазон
	Беречь от влаги		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Не использовать при повреждённой упаковке		Не допускать воздействия солнечного света
ГОСТ 31340-2013			
	«Восклицательный знак» Сигнальное слово: «Осторожно» Место нанесения: «Лизирующий буфер» H302: Вредно при проглатывании H315: При попадании на кожу вызывает раздражение H319: При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение		

Дата создания 10.08.2020 г.

Краткая схема анализа набора реагентов «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин»

ВНИМАНИЕ! Держать образцы выделенной РНК, приготовленную реакционную смесь, и планшет (стрипы) при низкой температуре (ледяная баня или хладагент) для предотвращения получения ложных результатов

1 ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

- 1 Инкубировать «Лизирующий буфер» при комнатной температуре 30 минут
- 2 Ввести программу в амплификатор: 70 циклов по 30 секунд с измерением флуоресценции на канале SYBR (FAM) каждые 30 секунд при 65 °С. Если в амплификаторе предусмотрено, то не забыть прогреть крышку

2 ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА ДЛЯ ПЦР

Рассчитать необходимое количество лунок (N):

$N = n + 2$, где n – количество образцов выделенной РНК (см. п. 3); 2 – «К+» и «К-»

3 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

- 1 Если клинические образцы заморожены, предварительно разморозить их
- 2 Клинические образцы интенсивно перемешать
- 3 В чистый новый эппендорф добавить 100 мкл «Лизирующего буфера» и 25 мкл клинического образца
- 4 Каждый эппендорф интенсивно перемешать на вортексе 2-5 секунд
- 5 Инкубировать 20 минут при 70 °С
- 6 Каждый эппендорф интенсивно перемешать на вортексе 2-5 секунд
- 7 Хранить при 2 - 8 °С не более 20 минут

4 ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ВНЕСЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ В ПЛАНШЕТ ДЛЯ ПЦР

- 1 Поместить планшет для ПЦР (см. п. 2) на ледяную баню или хладагент (не замораживать)
- 2 Внести в чистый новый эппендорф холодные! компоненты «РС» и «Фермент» в следующих объемах: Объем «РС» = $(N + 1) * 14$ мкл; объем «Фермент» = $(N + 1) * 1$ мкл, где N - количество лунок (из пункта 2) В пропорции 14:1
- 3 Внести в каждую лунку планшета по 15 мкл холодной приготовленной реакционной смеси

5 ВНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ВЫДЕЛЕННОЙ РНК И КОНТРОЛЕЙ («К+» И «К-»)

- 1 В лунки планшета внести по 5 мкл образцов выделенной РНК (см. п. 3). Для каждого образца выделенной РНК использовать новый наконечник и с помощью него пипетировать содержимое лунки.
- 2 Аккуратно открыть пробирки с «К+» и «К-» (для исключения контаминации) и внести в предпоследнюю и последнюю лунки планшета - по 5 мкл контрольных образцов, используя новый наконечник и с помощью него пипетировать содержимое лунки
- 3 Заклеить планшет пленкой

7 Постановка в амплификатор

Планшет незамедлительно поставить в амплификатор с уже введенной программой и начать проведение анализа!

8 Интерпретация результатов

для «К+» Ct меньше 50
для «К-» Ct не определяется

положительный образец - Ct меньше 50
отрицательный образец - Ct больше 60

Внимание! При внесении реакционной смеси в лунки без анализируемых образцов, в данных лунках могут наблюдаться ложноположительные результаты

Примечание

При нарушении условий проведения анализа возможно получение ложноположительного сигнала. Критическим моментом является нагревание приготовленной реакционной смеси до момента запуска реакции. При нагревании приготовленной реакционной смеси происходит активация полимеразы и начало неспецифического синтеза. Это может приводить как к синтезу неспецифической РНК и получению ложноположительного сигнала. Кроме того, активация полимеразы может приводить и к преждевременному истощению компонентов приготовленной реакционной смеси (как правило, нуклеотидов), и, как следствие, получению ложноотрицательных результатов, в том числе и при положительном контроле.

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

20.12.2020



ПРОШУ
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«10» 08 20120 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.