

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «ЭКОлаб»

В.Ю. Борисов

«09» 07/2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «КовидЭк» для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, серия 01, серия 02

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «КовидЭк» для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, серия 01, серия 02 предназначен для выделения и качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в препаратах нуклеиновых кислот (анализируемые образцы), выделенных из проб клинического материала, полученных при взятии мазка из носа, носоглотки и/или ротоглотки человека, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Функциональное назначение **набора реагентов «КовидЭк»** - диагностика инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2.

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

Полученные результаты анализа свидетельствуют о наличии/отсутствии РНК коронавируса SARS-CoV-2 в пробах клинического материала. Наличие РНК коронавируса SARS-CoV-2 в исследуемых образцах является основанием для постановки диагноза-коронавирусная инфекция COVID-19.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Потенциальные потребители изделия

Набор реагентов предназначен только для профессионального использования в медицинских и научно-исследовательских учреждениях, работа лабораторий которых обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Для работы с набором реагентов сотрудники лаборатории должны иметь среднее или высшее образование (медицинское, биологическое, ветеринарное), прошедшие подготовку на лицензированных курсах по работе с микроорганизмами II групп патогенности и курсах повышения квалификации по молекулярно-биологической диагностике

Показания к применению изделия.

Применение набора реагентов «КовидЭк» показано

- в качестве основного средства этиологической лабораторной диагностики COVID-19 у пациентов с клиническими проявлениями вирусно-бактериальных поражений легких;
- при обследовании пациентов с симптомами ОРВИ;
- при обследовании лиц, контактировавших с инфицированными SARS-CoV-2, с целью диагностики раннего периода, бессимптомных и стертых форм заболевания;
- при обследовании лиц, прибывающих из регионов с высоким уровнем инфицирования SARS-CoV-2, и их повторном обследовании перед выходом из обсервации;
- для определения SARS-CoV-2-статуса обследуемого (параллельно с иммунологическими тестами).

Противопоказания

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены, за исключением

- Истекший срок годности набора реагентов
- Нарушение внутренней упаковки компонентов набора
- Внешний вид компонентов не соответствует их описанию в инструкции
- Ненадлежащие условия хранения и /или транспортирования набора реагентов

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

COVID-19 является инфекционным заболеванием, вызванным новым коронавирусом SARS-CoV-2, который ранее не был обнаружен у людей.

Вирусная инфекция приводит к развитию респираторного гриппоподобного заболевания с такими симптомами, как кашель и лихорадка. В более тяжелых случаях может развиваться пневмония. Средний инкубационный период COVID-19 составляет 6,5 дня, но может варьироваться от 3 до 21 дней.

По данным текущего эпидемиологического исследования, инкубационный период составляет от 1 до 14 дней, в основном от 3 до 7 дней. Основные проявления включают потерю обоняния, утомляемость, жар и сухой кашель. В некоторых случаях обнаруживаются заложенность носа, насморк, боль в горле, миалгия и диарея.

На ранней стадии заболевания общее количество лейкоцитов в периферической крови в норме или снижено, а количество лимфоцитов уменьшено. У некоторых пациентов отмечалось повышение уровня ферментов печени, мышечных ферментов и миоглобина. СРБ и скорость оседания эритроцитов повышены у большинства пациентов, а прокальцитонин в то же время в норме. В тяжелых случаях количество D-димера увеличивается, а лимфоциты периферической крови постепенно уменьшаются. Нуклеиновую кислоту нового коронавируса SARS-CoV-2 можно обнаружить в мазках из горла, мокроте, секретах нижних дыхательных путей, крови и других образцах.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Набор «КовидЭк» выпускается в двух вариантах комплектации Комплект 1 «РНК Экстракт» и Комплект 2 «РНК Магнит», отличающихся:

- способом выделения РНК из клинического материала, для последующего исследования методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени;
- аналитической чувствительностью (пределом обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2).

Наименование компонента	Характеристика компонента	Комплект 1 «РНК Экстракт»	Комплект 2 «РНК Магнит»
Реагенты для амплификации:			
ОТ-ПЦР-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (0,5 мл)	1 пробирка (0,5 мл)
Праймеры COVID-19	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка. (0,2 мл)	1 пробирка. (0,2 мл)
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних вк	1 пробирка (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)
Реагенты для выделения РНК			
Высаливающий раствор (ВР)	Прозрачная жидкость без механических примесей	1 фл. (30 мл)	-
Осаждающий раствор (ОР)	Прозрачная жидкость без механических примесей	1 фл. (110 мл)	-

Магнитный сорбент	Суспензия от коричневого до черного цвета, образующая осадок	-	1 пробирка (1,5 мл)
Сорбирующий раствор	Прозрачная жидкость без механических примесей	-	1 фл. (30-мл)
Промывочный раствор (ПР)	Прозрачная жидкость без механических примесей	1 фл. (100 мл)	1 фл. (30 мл)
Элюирующий раствор (ЭР)	Прозрачная жидкость без механических примесей	1 фл. (15 мл)	1 фл. (15 мл)
Инструкция		1 шт.	1 шт.

Примечания:

- 1) В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).
- 2) В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Каждый комплект «КовидЭк» рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные.

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Метод исследования состоит из нескольких этапов: выделение РНК SARS-CoV-2, реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результата.

Из клинических образцов (мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки), производится экстракция РНК SARS-CoV-2.

Метод очистки суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов для выделения РНК Комплекта 1 “РНК Экстракт” набора реагентов «КовидЭк» основан на осаждении нуклеиновых кислот спиртовым раствором с последующей промывкой осадка для удаления нежелательных примесей и растворением в буфере с низкой ионной силой.

Метод выделения суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов для выделения РНК Комплект 2 “РНК Магнит” набора реагентов «КовидЭк» основан на связывании нуклеиновых кислот с магнитным сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера.

Выделенная РНК SARS-CoV-2 подвергается обратной транскрипции с помощью ревертазы. Участки полученной кДНК амплифицируют при помощи специфичных к данным участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В состав реакционной смеси включены флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (ДНК-зонды). Данные ДНК-зонды, содержащие флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой к ДНК-мишени. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, воздействие гасителя на флуоресцентную метку прекращается. В результате происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Количество разрушенных зондов увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Нарастающий уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В состав набора реагентов входит положительный контрольный образец (ПКО), представляющий собой MS2 фагоподобные частицы, содержащие фрагмент генома коронавируса SARS-CoV-2.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Забор, хранение и транспортирование клинического материала (назо- и орофарингеальные мазки), взятого у пациентов для установления факта инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2, а также манипуляции с полученными образцами (обработка, хранение, транспортировка) регламентированы следующими документами:

- МУ 1.3. 2569-09 (Приложение 2 «Забор, предварительная обработка, хранение и перевозка материала на исследование»);

- письмом Роспотребнадзора от 21 января 2020 года N 02/706-2020-27 (Приложение 1 «Временные рекомендации по лабораторной диагностике новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV»);

- ВМР МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», п.3.3. «Лабораторная диагностика коронавирусной инфекции».

Внимание! Следует рассматривать пробы клинического материала, как потенциально инфекционно-опасные.

Внимание! Пробы клинического материала, в отношении которого были выявлены нарушения требований данного раздела инструкции, считаются непригодными для исследования.

Пробы клинического материала, хранившиеся в холодильнике/морозильнике, перед анализом прогреть до температуры (20 – 28) °С и аккуратно перемешать.

Избегать повторных циклов замораживания/оттаивания проб клинического материала.

Анализируемые образцы для ОТ-ПЦР – образцы выделенной РНК из проб клинического материала.

Объем анализируемого образца для ОТ-ПЦР составляет 10 мкл.

Сбор назофарингеальных мазков (мазков из носа, носоглотки)

Мазки (слизь) берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащую специальную транспортную среду (физраствор), и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Сбор орофарингеальных мазков (мазков из ротоглотки)

Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой (физраствором) и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре — в течение 6 ч;
- при температуре 2–8 °С — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С — в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С — длительно. Допускается лишь однократное замораживание/оттаивание материала.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность (Предел обнаружения РНК коронавируса человека SARS-CoV-2) с использованием КОЧ (Контрольного образца чувствительности) составляет 1×10^3 геном-эквивалентов в 1 мл анализируемого образца в реакции ОТ-ПЦР для Комплекта № 1 "РНК Экстракт" и 5×10^2 геном-эквивалентов в 1 мл анализируемого образца в реакции ОТ-ПЦР для Комплекта № 2 "РНК Магнит".

2. Специфичность набора реагентов: значение Ct по каналам «HEX» и «FAM» должны иметь значения меньше или равно 35 для «ПКО»; значение Ct по каналам «HEX» и «FAM» не должны определяться для «ОКО».

3. Аналитическая специфичность набора реагентов была определена посредством исследования образцов нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций: вирусы гриппа А и В, парагрипп, аденовирусная инфекция, респираторно-синцитиальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека (MERS-CoV, HKU1, 229E, OC43, NL63, SARS-CoV), Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenza type B, Legionella pneumophila. Перекрестных реакций не выявлено.

4. Влияние интерферирующих веществ

Содержание муцина или цельной крови, назального спрея, стероидов для кожи носа, средств для снятия аллергических симптомов, противовирусных препаратов, антибиотиков в мазках из носа, носоглотки и/или ротоглотки не влияет на результат анализа

Материал	Активный компонент	Заключение
Назальный спрей	Оксиметазолин 50% об/об, хлорид натрия (консервант)	Добавление мешающего вещества до соответствующей концентрации не оказало значительного влияния на результат теста.
Стероид для кожи носа	Беклометазон 2,5 мг/мл, флунизолид 10 мг/мл, триамцинолона ацетонид 10 мг/мл, мометазон 10 мг/мл, флутиказон 5 мг/мл	
Средства для снятия аллергических симптомов	Гистамина гидрохлорид 3 мг/мл	
Противовирусные препараты	Альфа-интерферон 1000 МЕ/мл, занамивир 5 мг/мл, рибавирин 142 нг/мл, осельтамивир 0,15 мг/мл, лопинавир 4 мкг/мл, ритонавир 1 мкг/мл	
Антибиотики	Левифлоксацин 0,1 г/мл, Азитромицин 0,25 г/мл	
Муцин (до 5% по объему)		
Цельная кровь (до 5% по объему)		

5. Диагностическая чувствительность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2 – 100% (200 положительных образцов, интервал 98,51, %-100%, с доверительной вероятностью 95%).

6. Диагностическая специфичность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2 – 100% (250 отрицательных образцов, интервал 98,81%-100%, с доверительной вероятностью 95%).

7. Воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость результатов определялась тестированием 3 образцов, полученных из назальных/назофарингеальных мазков, контаминированных штаммом вируса SARS-CoV-2 в количестве 0,1 Ig TCID50/мл (1×10^3 ГЭ/мл), в 20 повторах на наборах реагентов одной серии и составляет 100%.

Межсерийная воспроизводимость результатов определялась тестированием 3 образцов, полученных из назальных/назофарингеальных мазков, контаминированных штаммом вируса SARS-CoV-2 в количестве 0,1 Ig TCID50/мл (1×10^3 ГЭ/мл), на 3 сериях набора реагентов и составляет 100%.

Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с РНК и ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Меры предосторожности.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Согласно Временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», утвержденных Минздравом России 03.09.2020 (версия 8), 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)". При работе с набором реагентов необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

1.1. Требования к помещениям, оборудованию, расходным материалам.

Температура в помещениях лаборатории при проведении исследований должна быть от 20 до 28 °С, относительная влажность - от 15 до 75 %.

Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

Каждый этап анализа должен проводиться в специально выделенных рабочих зонах (помещениях). Лабораторный процесс должен быть однонаправленным (работу следует начинать в зоне (помещении) экстракции, продолжать в зонах (помещениях) амплификации и детекции).

Запрещается перемещать лабораторное оборудование, дозаторы, штативы, посуду, рабочую одежду, головные уборы и др. из одного помещения в другое.

Дозаторы и другое измерительное и дозирующее оборудование должны быть поверены и промаркированы.

Использовать одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку *RNase-free*, *DNase-free*. Для манипуляций с набором реагентов, пробами клинического материала и анализируемыми образцами (пробами выделенной РНК) использовать одноразовые пробирки и наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером, одноразовые перчатки без талька.

Для каждой операции использовать новые наконечники с аэрозольным барьером.

1.2. Безопасность персонала

Внимание! Требования к персоналу, использующему в работе набор реагентов «КовидЭк», указаны в п.1.3. настоящей инструкции.

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

Тщательно вымыть руки по окончании работы.

В компонентах «Сорбирующий раствор», «Высаливающий раствор» и «Осаждающий раствор» содержится гуанидин тиоционат, вызывающий ожоги и повреждения глаз, вреден при проглатывании. Не разбрызгивать! Следует избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. В случае приема внутрь компонентов набора немедленно обратиться за медицинской помощью.

Изопропиловый спирт и ацетон, входящие в состав компонентов «Сорбирующий раствор», «Промывочный раствор» и «Осаждающий раствор» обладает раздражающим действием. Не проводить работы с «Сорбирующим раствором», «Промывочным раствором» и «Осаждающим раствором» в непосредственной близости от открытого огня.

В случае приема внутрь компонентов набора реагентов немедленно обратиться за медицинской помощью.

Все реагенты, входящие в состав компонентов набора реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

Набор реагентов не содержит материалы биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным и влияющим на репродуктивную

функцию человека действием. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Весь клинический материал является потенциально инфицированным, поэтому при работе с ним необходимо использовать индивидуальные средства защиты: лабораторные перчатки, лабораторные халаты, шапочку, очки защитные, полумаску, нарукавники одноразовые.

1.3. Сведения о дезинфекции и утилизации

Все использованные материалы, инструменты и оборудование, рабочие поверхности дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13-08 и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Все поверхности в лаборатории ежедневно подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.3118-13-08.

Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

Токсичные отходы не образуются в процессе использования и утилизации набора реагентов с истекшим сроком годности.

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.

При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Неиспользованные компоненты, компоненты с истекшим сроком годности, а также использованные компоненты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса защиты
- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени» (например, CFX96, ДТ-96, QuantStudio 5);
- оптические пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл с возможностью термостатирования при 65 °С;
- микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл со скоростью вращения не менее 12 000 об/мин;
- вортекс;
- набор дозаторов переменного объема (1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

- магнитный штатив (не обязателен, если используется протокол Комплекта 2 «РНК Магнит» с центрифугированием или автоматизированной станцией);
- автоматизированная станция (при ее использовании).

Примечание * При работе с РНК необходимо использовать расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК

1.1. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования осуществляется в соответствии с существующими ТНПА, методическими рекомендациями и инструкциями.

Исследуемые образцы непосредственно перед выделением РНК тщательно гомогенизируют на вортексе, капли материала с внутренней части крышки убирают кратковременным центрифугированием при минимальных скоростях.

1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК с использованием Комплекта 1 «РНК Экстракт»

Установить температуру на термостате 65 °С.

0. В случае выпадения осадка в **Высаливающем и/или Осаждающем растворах** растворить кристаллы интенсивным встряхиванием, допускается прогревание раствора до температуры 37 °С для лучшего растворения кристаллов.

I. В каждую пробирку внести по **300 мкл Высаливающего раствора** и по **10 мкл ВКО** (при его использовании).

II. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца** (см. Подготовка исследуемого материала).

При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), добавить 100 мкл Элюирующего раствора или ОКО (отрицательного контрольного образца). ОКЭ рекомендуется ставить при каждой постановке выделения.

III. Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65 °С**.

IV. Добавить в пробирки по **600 мкл Осаждающего раствора**, перемешать на вортексе в течение 10 с, инкубировать 30 с при комнатной температуре.

V. Центрифугировать в течение **5 мин** при **12 000 об/мин**.

VI. Не задевая осадок аккуратно удалить надосадочную жидкость.

VII. Добавить в пробирки по **500 мкл Осаждающего раствора**, промыть осадок, переворачивая пробирки 3–5 раз.

VIII. Центрифугировать в течение **1 мин** при **12 000 об/мин**.

IX. Не задевая осадок аккуратно удалить надосадочную жидкость

X. Внести в пробирки с осадком по **1 000 мкл Промывочного раствора**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3–5 раз.

XI. Центрифугировать в течение **1 мин** при **12 000 об/мин**.

XII. Не задевая осадок аккуратно удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Для наилучшего удаления надосадочной жидкости рекомендуется: дать пробе постоять при комнатной температуре в течение 30–60 с и отобрать отстоявшуюся надосадочную жидкость повторно.

XIII. Инкубировать пробирки с открытыми крышками в термостате в течение **5 мин** при температуре **65 °С** для подсушивания осадка.

XIV. Добавить в пробирки по **50 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе. При необходимости, допускается увеличение объема Элюирующего раствора до 150 мкл.

XV. Инкубировать пробы в термостате в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом перемешивании. Допускается краткосрочное перемешивание на вортексе.

XVI. Центрифугировать пробирки в течение **1 мин** при **12 000 об/мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

XVII. Для хранения образцов рекомендуется перенести надосадочную жидкость в новые пробирки. Допускается хранение образцов в течение суток при температуре не выше 4 °С или в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

1.3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК НА МАГНИТНОМ ШТАТИВЕ

Установить температуру на термостате 65 °С.

0. В случае выпадения осадка прогреть **Сорбирующий раствор** при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

I. В подходящей по объему емкости приготовить смесь, содержащую **Сорбирующий раствор, Магнитный сорбент и ВКО** (при его использовании), из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора, 15 мкл Магнитного сорбента и 10 мкл ВКО** на проведение одного выделения. Полученную смесь перемешать.

II. В каждую пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести по **325 мкл приготовленной смеси** (по 315 мкл, если ВКО не используется).

III. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца** (см. подготовка исследуемого материала).

При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл Элюирующего раствора.

IV. Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.

V. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

VI. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30-60 сек.** Не затрагивая магнитный сорбент аккуратно удалить надосадочную жидкость.

VII. Добавить в каждую пробирку по **300 мкл Промывочного раствора** и перемешать на вортексе.

VIII. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

IX. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30-60 сек.** Аккуратно не затрагивая магнитный сорбент удалить надосадочную жидкость. На данном этапе необходимо как можно тщательнее отобрать надосадочную жидкость, так как в дальнейшем остатки Промывочного раствора 2 могут вызвать ингибирование ПЦР.

X. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе.

XI. Инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65°С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.

XII. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

XIII. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30-60 сек.** Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

XIV. Для хранения образцов рекомендуется перенести надосадочную жидкость в новые пробирки. Допускается хранение образцов в течение суток при температуре не выше 4 °С или в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

1.3.2. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК НА ЦЕНТРИФУГЕ

Установить температуру на термостате 65 °С.

0. В случае выпадения осадка прогреть **Сорбирующий раствор** при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

I. В подходящей по объему емкости приготовить смесь, содержащую **Сорбирующий раствор, Магнитный сорбент и ВКО** (при его использовании), из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора, 15 мкл Магнитного сорбента и 10 мкл ВКО** на проведение одного выделения. Полученную смесь перемешать.

II. В каждую пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести по **325 мкл приготовленной смеси** (по 315 мкл, если ВКО не используется).

III. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца** (см. подготовка исследуемого материала).

При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл Элюирующего раствора.

IV. Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.

V. Осадить магнитный сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин**, удалить надосадочную жидкость.

VI. Добавить в каждую пробирку по **300 мкл Промывочного раствора** и перемешать на вортексе.

VII. Осадить магнитный сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин**, удалить надосадочную жидкость.

На данном этапе необходимо как можно тщательнее отобрать надосадочную жидкость, так как в дальнейшем остатки Промывочного раствора 2 могут вызвать ингибирование ПЦР.

VIII. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе.

IX. Инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65°С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.

X. Осадить магнитный сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин** Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

XI. Для хранения образцов рекомендуется перенести надосадочную жидкость в новые пробирки. Допускается хранение образцов в течение суток при температуре не выше 4 °С или в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

1.3.3. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК НА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СТАНЦИИ

0. В случае выпадения осадка прогреть **Сорбирующий раствор** при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

I. В **Сорбирующий раствор** внести **Магнитный сорбент** и **ВКО** (если оно используется в тест-системе).

II. Разнести по лункам 1-го планшета **Сорбирующий раствор** с **Магнитным сорбентом** и **ВКО** (если оно используется в тест-системе) по **315 мкл** (или **325 мкл**, если используется **ВКО**).

III. Разнести по лункам 2-го планшета **Промывочный раствор** по **300 мкл**.

IV. Разнести по лункам 3-го планшета **Элюирующий раствор** по **100 мкл**.

V. В каждую лунку планшета с **Сорбирующим раствором** и **Магнитным сорбентом** и **ВКО** (если оно используется в тест-системе) добавить по **100 мкл образца** (см. подготовка исследуемого материала). При необходимости в лунку для ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл **ОКО** (отрицательный контрольный образец, поставляется вместе с тест-системами).

VI. Установить все планшеты в прибор.

VII. Запрограммировать прибор:

А) Инкубация образца в Сорбирующем растворе и Магнитном сорбенте течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном перемешивании;

Б) Инкубация образца в **Промывочном растворе** в течение **2 мин** при без термостатирования при постоянном перемешивании;

В) Инкубация образца в **Элюирующем растворе** в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном перемешивании;

Г) Собрать магнитный сорбент и сбросить гребенку для магнитных стержней.

VIII. Запустить программу экстракции.

IX. После окончания работы прибора, планшет с **Элюирующим раствором** извлечь. **Элюирующий раствор** содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

X. Допускается хранение образцов в течение 4 часов при температуре не выше 4 °С или в течение 1 суток при температуре не выше минус 16 °С.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.1. ПОДГОТОВКА ПЦР-СМЕСИ

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5-2 мл приготовить «Мастер Микс»:

5*(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента + 15*(N+1) мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

II. Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

III. В подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых мазков.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

1) К- – внести в пробирку 10 мкл ОКО;

2) К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКО.

3) ОКЭ – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

2.2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/Yellow	60	15 сек	40
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

IV. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор*.

* Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для всех каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene»*:

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 5%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0–30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02–0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96»*:0

– установить значение параметра пороговой линии («Single Threshold») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25–500**;

– при необходимости допускается активация функций «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve-fit».

в) для приборов «ДТ-96»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

г) для приборов «Quant Studio 5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

д) для прочих амплификаторов – см. примечание².

* в зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.

** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow
ОКО	ПЦР	Не детектируется	Не детектируется
ПКО	ПЦР	≤35	≤35
ВКО	ПЦР	≤35	≤35
ОКЭ	ПЦР	Не анализируется	Не детектируется

В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов начиная со стадии экстракции РНК.

В случае несоответствия контрольных точек ОКО и ПКО необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Таблица интерпретации результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	+/-	33–35
Отрицательный	+	> 35 или отсутствует
Не валидный	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

—» – значение «Ст» для данного канала не анализируется

В случае сомнительного или не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции РНК или со стадии забора материала у пациента.

Повторный сомнительный результат считается отрицательным и не требует перестановки. Повторный не валидный результат свидетельствует о некачественном отборе клинического материала и требует перепостановки начиная с этапа отбора клинического материала.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «КовидЭк» – 12 месяцев с даты приемки ОБТК предприятия-изготовителя. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение реагентов для амплификации: ОТ-ПЦР-реагента, праймеров COVID-19, положительного контрольного образца (ПКО, отрицательного контрольного образца (ОКО) наборов должно осуществляться в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия изготовителя при температуре от -24°C до -16°C в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от -24°C до -16°C до истечения срока годности.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов набора реагентов до 10 раз.

Хранение реагентов для выделения РНК Комплекта №1: высаливающего раствора (ВР), осаждающего раствора (ОР), промывочного раствора (ПР), элюирующего раствора (ЭР); **Комплекта №2:** магнитного сорбента, сорбирующего раствора, промывочного раствора (ПР), элюирующего раствора (ЭР), должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8°C до истечения срока годности.

Транспортирование: При температуре от 2 до 8°C транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, в течение 30 суток. Допускается транспортирование при температуре окружающей среды, но не выше 37°C в течение 5 суток.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «КовидЭк» для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, серия 01, серия 02 соответствует ТУ 21.20.23-120-70423725-2021 с учетом изм.№1, Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «КовидЭк», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, 1а, Закрытое Акционерное Общество «ЭКОлаб» (ЗАО «ЭКОлаб»); тел. 8 (49643) 3-23-11, 3-30-93, тел/факс 8(49643) 3-30-85, 8 (800) 333-33-47, ekolab-sekretar@mail.ru.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;

3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

IVD	Только для диагностики <i>in vitro</i>
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Хранить при температуре
	«Восклицательный знак»
	«Коррозия.Едкость»
	«Пламя»

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

С.Г. Марданлы

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

« 09 » 04 2021 г.

П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ



04 07 2021 год
Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавинус П.К.

Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью



74 лист 06
Ген. Директор ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.
"06" 2021 г.