

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института химической биологии
и фундаментальной медицины Сибирского
отделения Российской академии наук

ИХБФМ СО РАН

Д.В. Пышный

«15» июня 2021 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«Набор реагентов для качественного выявления РНК

коронавируса SARS-CoV-2 из мазков носоглотки и/или ротоглотки человека

методом модифицированной петлевой изотермической

амплификации с визуальной детекцией»

в двух вариантах комплектации

по ТУ 21.20.23-001-01538629-2021,

серия 210615

Комплект № 1 «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96-S»

Кат. № C-0003

Комплект № 2 «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96»

Кат. № C-0004

Регистрационное удостоверение № РЗН 0000/0000 от 00 00 2021 года

ООО «Современные лабораторные технологии»

2021

Оглавление

1. Назначение набора реагентов.....	3
2. Принцип действия набора	4
3. Состав набора.....	5
4. Аналитические характеристики	6
5. Меры предосторожности	7
6. Оборудование и материалы	8
7. Материал для исследования	9
8. Подготовка анализируемых образцов и компонентов набора реагентов	10
9. Проведение LAMP.....	11
10. Учет и интерпретация результатов LAMP.....	13
11. Контроль качества	14
12. Ограничения по использованию.....	14
13. Хранение, транспортировка и утилизация.....	14
14. Гарантии производителя и сведения о рекламациях	15
15. Производитель	15
16. Разработчик.....	16
17. Символы, применяемые для маркировки компонентов набора реагентов	16
18. Цветовой тест	16

1. Назначение набора реагентов

1.1 Настоящая инструкция распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 из мазков носоглотки и/или ротоглотки человека методом модифицированной петлевой изотермической амплификации с визуальной детекцией» в двух вариантах комплектации по ТУ 21.20.23-001-01538629-2021, серия 210615. Комплект № 1 «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96-S» и Комплект № 2 «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96».

– Комплект № 1 – рассчитан на 96 определений, где краситель находится в крышках для стрипованных микропробирок: «**QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96-S**»;

– Комплект № 2 – рассчитан на 96 определений, где краситель находится в крышках для отдельных микропробирок: «**QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96**».

1.2 Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные.

1.3 Набор реагентов предназначен для качественного выявления (скрининг, мониторинг) наличия или отсутствия рибонуклеиновой кислоты (далее – РНК) коронавируса SARS-CoV-2 в анализируемых образцах нуклеиновых кислот (далее – НК), выделенных из проб клинического материала, полученных при взятии мазка из носоглотки и/или ротоглотки методом модифицированной петлевой изотермической амплификации (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) с визуальной детекцией у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания, схожего с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, в особенности прибывающих из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактных лиц («Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-2019)» утвержденные Минздравом РФ»).

1.4 Набор реагентов рекомендуется использовать для поддержки диагностики острой респираторной инфекции - COVID-2019 при исследовании материала от больных с подозрением на заболевание и индикации патогенного биологического агента (ПБА).

1.5 Набор реагентов применяется только для диагностики *in vitro*.

1.6 Показания к применению.

Набор реагентов следует использовать:

- как вспомогательное средство 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 детекции раннего периода, бессимптомных и стертых форм заболевания;
- при обследовании лиц, прибывающих из регионов с высоким уровнем инфицирования SARS-CoV-2 и их повторное обследование перед выходом из обсервации;
- параллельно с иммунологическими тестами для определения SARS-CoV-2-статуса обследуемого.

1.7 Противопоказания

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

- 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.
- Другие противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

1.8 Время проведения анализа (не включая стадию выделения РНК) составляет 25 мин для каждого комплекта.

1.9 Анализ проводится в клиничко-диагностической лаборатории (КДЛ) методом петлевой изотермической амплификации (LAMP) в термостате типа «TDB-120» с термоблоком А-103 («Biosan», Латвия) или амплификаторе «Термоциклер Т-100» («Bio-Rad», США).

1.10 Потенциальные пользователи: квалифицированный медицинский персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

1.11 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

1.12 Побочные действия

Побочные действия, связанные с применением набора, отсутствуют.

2. Принцип действия набора

2.1 Принцип метода набора реагентов основан на модифицированной петлевой изотермической амплификации (LAMP) генетического материала SARS-CoV-2 после выделения его РНК с конверсией в комплементарную ДНК (далее - кДНК) из анализируемых образцов.

2.2 Преимуществом набора реагентов являются:

- высокая скорость получения результатов;
- отсутствие дорогостоящих амплификаторов для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
- быстрое одноэтапное выделение РНК из клинического материала, собранного в физиологический раствор;
- детекция проводится визуальным методом, по окраске пробирок после проведения анализа.

2.3 В качестве анализируемого материала могут использоваться выделенные НК с помощью наборов и комплектов, зарегистрированных в установленном порядке на территории Российской Федерации, например: «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (РУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.), «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус (вариант 4х24)» по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020, ООО Вектор-Бест, Россия (РУ №РЗН 2020/11364 от 22.09.2020).

2.4 Детекция оценивается визуально с помощью «цветового теста» (см. п. 18):

- анализируемый образец является положительным (содержащим РНК SARS-CoV-2), то окраска реакционной смеси меняется на зеленую или желто-зеленую.

– анализируемый образец является отрицательным (не содержащим РНК SARS-CoV-2), то окраска реакционной смеси меняется на оранжевую.

3. Состав набора

3.1 Состав набора реагентов Комплекта № 1 представлен в таблице 1:

Таблица 1

QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96-S, фасовка в стрипованных микропробирках			
Компонент	Характеристика и внешний вид	Количество	Объем
1. NA-FAST – лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	2 флакона	по 5,5 мл
2. ISO-P – набор олигонуклеотидных праймеров	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	270 мкл
3. ISO-B – реакционный буферный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость без примесей	1 пробирка	1300 мкл
4. ISO-E –Gss-полимераза	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость без примесей	1 пробирка	55 мкл
5. ПКО – положительный контрольный образец	Краситель красного цвета лиофильно высушенный	2 пробирки	по 1,8 мг
6. РБ – разбавитель	Раствор для разбавления ПКО; прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка	350 мкл
7. ОКО – отрицательный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка	1400 мкл
8. Краситель	Сухое вещество оранжевого цвета в крышках для стрипов	96 шт крышек для стрипов	по 1,2 мг
9. Стрипы	-	12 стрипов по 8 пробирок	

3.2 Состав набора реагентов Комплекта № 2 представлен в таблице 2:

Таблица 2

QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96, фасовка в микропробирках			
Компонент	Характеристика и внешний вид	Количество	Объем
1. NA-FAST – лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	2 флакона	по 5,5 мл
2. ISO-P – набор олигонуклеотидных праймеров	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	270 мкл
3. ISO-B – реакционный буферный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость без примесей	1 пробирка	1300 мкл
4. ISO-E –Gss-полимераза	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость без примесей	1 пробирка	55 мкл
5. ПКО – положительный контрольный образец	Краситель красного цвета лиофильно высушенный	2 пробирки	по 1,8 мг
6. РБ – разбавитель	Раствор для разбавления ПКО; прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка	350 мкл
7. ОКО – отрицательный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних включений	1 пробирка	1400 мкл
8. Краситель	Сухое вещество оранжевого цвета в крышках отдельных микропробирок	96 шт микропробирок	по 1,2 мг

3.3 В комплект поставки для каждого комплекта также входят:

- Инструкция по применению – 1 шт.;
- Бумажный вкладыш – («цветовой тест») – 1 шт.;
- Паспорт качества – 1 шт.

3.4 Необходимо в каждую постановку анализируемых образцов включать все контрольные образцы (**ПКО** и **ОКО**).

3.5 Для приготовления рабочего раствора **ПКО** требуется добавить в пробирку с компонентом **ПКО** 150 мкл компонента **РБ**.

Примечание: Количество экземпляров паспорта качества каждой серии определяется в договоре на поставку продукции. Инструкция по применению поставляется в бумажном виде и/или представлена на сайте производителя: www.slttrade.ru.

4. Аналитические характеристики

4.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет $5,0 \times 10^3$ копий РНК коронавируса SARS-CoV-2 в 1 мл анализируемого образца при выделении РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (ПУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.) или «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус (вариант 4х24)»» по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020, ООО Вектор-Бест, Россия (ПУ №РЗН 2020/11364 от 22.09.2020) и $2,5 \times 10^4$ копий РНК коронавируса SARS-CoV-2 в 1 мл анализируемого образца при быстром выделении РНК с помощью реагента NA-FAST.

Заявленный производителем предел обнаружения достигается при соблюдении регламентированных правил взятия, транспортировки, обработки и хранения проб клинического материала, а также при выполнении требований настоящей инструкции.

4.2 Чувствительность

Чувствительность набора реагентов определяли с использованием набора реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (ПУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.), «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус (вариант 4х24)»» по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020, ООО Вектор-Бест, Россия (ПУ №РЗН 2020/11364 от 22.09.2020) или реагента NA-FAST для быстрого выделения РНК и контрольной рабочей панели образцов «КПИ-SLT-ISO-SARS-CoV-2-П/О», содержащей синтетические фрагменты РНК коронавируса SARS-CoV-2, аттестованной отделом биологического и технологического контроля ООО «Современные лабораторные технологии» (далее по тексту - ООО «СЛТ»).

4.3 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность выявления РНК SARS-CoV2 составила 100,0% (25/25; $CI_{0,05}$: 86,7-100,0).

4.4 Диагностическая специфичность

Специфичность набора реагентов составила 100,0% (25/25; $CI_{0,05}$: 86,7 – 100,0).

4.5 Специфичность

Определяли с использованием контрольной панели образцов «КПИ-SLT-ISO-SARS-

CoV-2-П/О», содержащих и не содержащих инактивированную РНК вируса SARS-CoV-2 составляет 100 % без ложноположительных результатов.

4.6 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов была определена посредством испытания образцов нуклеиновых кислот респираторных инфекций: возбудителей респираторных инфекций: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, человеческие метапневмовирусы, *MERS-CoV*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza type B*, *Legionella*.

При тестировании вышеперечисленных заведомо отрицательных образцов положительные результаты отсутствовали.

4.7 Интерферирующие вещества (ингибиторы)

При использовании для выделения РНК из клинических образцов набора реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (РУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.), «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус (вариант 4х24)»» по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020, ООО Вектор-Бест, Россия (РУ №РЗН 2020/11364 от 22.09.2020) или реагента NA-FAST для быстрого выделения РНК, не выявлено влияния на результаты выявления РНК SARS-CoV2 в мазках из носоглотки и/или ротоглотки, содержащих гиалуроновой кислоты (эквивалента муцина до 5 % по объёму) или цельной крови (до 1 % по объёму для реагента NA-FAST и до 5% для набора реагентов «РИБО-преп» и «РеалБест Сорбитус (вариант 4х24)»).

5. Меры предосторожности

5.1 Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, соответствующих требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

5.2 Класс потенциального риска применения медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий - 3 (Приказ МЗ РФ № 4н от 06.06.2012 г.).

5.3 При работе с набором реагентов следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПин 3.3686-21.

5.4 Использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими растворами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5.5 Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПин 3.3686-21.

5.6 Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических или механических дозаторов. Одноразовые пластиковые материалы (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

5.7 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы, тапочки или сабо, защитные очки, полумаски, одноразовые перчатки, нарукавники и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

5.8 Лабораторное оборудование и принадлежности, которые используются при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.9 После окончания работ следует провести обработку рабочих поверхностей оборудования и влажную уборку дезинфицирующими растворами, включить бактерицидные лампы с целью предотвращения контаминации рабочих поверхностей оборудования.

5.10 Не использовать набор реагентов по истечении срока хранения, при нарушении условий транспортирования и хранения, при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте качества набора реагентов, при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов.

5.11 Компонент **NA-FAST** содержит трис-(2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорид, в низкой концентрации и является неопасным при использовании по назначению и не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

5.12 Компоненты **ISO-P** и **ISO-E** натрия азид в концентрации менее 0,1 %, являются неопасными при использовании по назначению и не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

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

5.14 При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Не допускать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Примечание: Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным и мутагенным действиями, а также влияющими на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности является безопасным.

6. Оборудование и материалы

- Бокс биологической безопасности II-III класса (ЗАО «Ламинарные системы» или аналогичный;
- Холодильная (2...8 °C) и морозильная (-18...-25 °C) камеры;
- Твердотельный термостат типа «TDB-120» с термоблоком A-103 («Biosan», Латвия) с гнездами для пробирок объемом 0,2 мл (оптимально 2 термостата) или амплификатор планшетный «Термоциклер T-100» («Bio-Rad», США);
- Мини-центрифуга-вортекс «Микроспин» FV-2400 («Biosan», Латвия», кат. № BS-010201-AAA, Латвия) с ротором R-1.5M для пробирок (кат. № BS-010201-AK) и ротором SR-64 для стрипов (кат. № BS-010201-AK) или аналогичное оборудование;

- Мини-центрифуга-вортекс «Микроспин» FV-2400 («SIA BIOSAN», кат. № BS-010201-AAA, Латвия) с ротором R-1.5M для пробирок (кат. № BS-010201-AK) и ротором SR-64 для стрипов (кат. № BS-010201-AK) или аналогичное оборудование;
- Дозаторы автоматические переменного объема на 0,2–2,0; 0,5-10; 2-20; 10-100; 20-200; 100-1000 мкл;
- Наконечники одноразовые без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- Наконечники одноразовые для дозаторов с фильтром объемом 0,5-10; 20; 200 и 1000 мкл;
- Пробирки одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом от 0,5 до 1,5 мл («Ахуген», США) или аналогичные;
- 96-луночный штатив для микропробирок объемом 0,2-0,5 мл;
- Таймер-часы;
- Приготовленный 1 % дезинфицирующий раствор «Мистраль», или аналогичный;
- Емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- Перчатки медицинские одноразовые неопудренные нитриловые или латексные, отдельный халат, нарукавники одноразовые, бахилы одноразовые;
- Физиологический раствор (0,9 %-ый раствор хлорида натрия) или транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640 от 14.02.2020);
- Зонд/тампон из хлопка или лавсана для взятия мазков из носоглотки и/или ротоглотки.

6.1 Для использования при выделении РНК из клинических образцов с помощью «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (РУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.) также необходимы:

- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

6.2 Для использования для выделения РНК из клинических образцов с помощью «Набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус (вариант 4x24)»» по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020, ООО Вектор-Бест, Россия (РУ № РЗН 2020/11364 от 22.09.2020) также необходимы:

- Магнитный штатив для пробирок объемом 1,5 (2,0) мл;
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

7. Материал для исследования

7.1 В качестве биологического материала для анализа используются мазки из носоглотки и/или ротоглотки, взятых у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания, схожего с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, в особенности прибывающих из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактных лиц («Временные методические рекомендации «Профилактика,

диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-2019)» утвержденные Минздравом РФ»).

7.2 Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

7.3 Мазки из носоглотки и/или ротоглотки следует хранить до начала исследования при температуре от минус 18 до минус 24 °С не более 1 месяца.

Внимание! Повторное замораживание-оттаивание проб клинического материала не допускается.

7.4 Особенности взятия биоматериала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» от 30.03.2020. Каждый образец биоматериала помещают в отдельную транспортную емкость, обеспечивая требования в соответствии с таблицей методических рекомендаций.

7.5 Транспортирование и хранение исследуемого материала, в соответствии с МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» от 30.03.2020.

8. Подготовка анализируемых образцов и компонентов набора реагентов

8.1 Перед началом проведения анализа вскрыть упаковку набора реагентов, проверив упаковку набора реагентов на целостность. Проверить пробирки на целостность и срок годности компонентов. Обнаружив повреждения, нарушения целостности или истечения срока годности компоненты набора реагентов следует утилизировать в соответствии с п.п. 13.3 настоящей инструкции.

8.2 Для подготовки анализируемого образца в пробирку объемом 1,5 мл с 500 мкл физиологического раствора внести мазок из носоглотки и/или ротоглотки, энергичными вращательными движениями произвести отделение клинического материала от зонда (тампона) в раствор, не допуская разбрызгивания потенциально зараженной суспензии, после чего зонд (тампон) утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09. В случае взятия мазка из носоглотки и/или ротоглотки от одного пациента клинический материал следует смывать с обоих зондов (тампонов) в одной и той же пробирке для увеличения вирусной нагрузки. Выделение РНК из приготовленных клинических образцов возможно с использованием наборов реагентов «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008, ФБУН ЦНИИЭ, Россия (РУ № ФСР 2008/03147 от 22.02.2019 г.), «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов «РеалБест Сорбитус (вариант 4x24)»» по ТУ 21.20.23-109-23548172-2020, ООО Вектор-Бест, Россия (РУ №РЗН 2020/11364 от 22.09.2020) в соответствии с инструкциями производителей, за исключением того, что для отрицательного контрольного образца используется 100 мкл **ОКО** из набора, для положительного контрольного образца используется 100 мкл **ОКО** плюс 5 мкл рабочего раствора ПКО (см. ниже пункт 8.3) из набора. Далее описан быстрый протокол выделения РНК из клинических образцов с использованием реагента **NA-FAST** из набора реагентов «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96».

8.3 Для начала работы с набором необходимо приготовить «Положительный контрольный образец» (**ПКО**). Для этого необходим пробирку с компонентом **ПКО** добавить 150 мкл раствора из пробирки с компонентом **РБ**. Поместить пробирку с **ПКО** в прогретый термостат до температуры 50-65 °С на 5 мин. Перемешать на вортексе в течение 3-5 сек, осадить капли с крышки кратким центрифугированием в течение 3 сек. Проследить наличие полного растворения содержимого на дне пробирки, имеющего

красный цвет. Хранить разведенный **ПКО** при температуре от -15 до -25 °С не более 1 месяца. Разведение второй пробирки **ПКО** из набора начинать только после полного использования первой пробирки или истечения 1 месяца ее хранения.

8.4 Разморозить флакон с компонентом **NA-FAST** при комнатной температуре, перемешать содержимое. Добавить в необходимое количество промаркированных рабочих микропробирок по 100 мкл **NA-FAST** (по количеству клинических образцов, включая **ПКО** и **ОКО**).

8.5 В приготовленные рабочие микропробирки с раствором **NA-FAST** внести, используя наконечники с аэрозольным барьером, по 100 мкл анализируемых образцов (приготовленных согласно п. 8.2). Перемешать пипетированием содержимое пробирок с образцами и **NA-FAST**.

8.6 В пробирку ОКВ (отрицательный контроль выделения) внести 100 мкл компонента **ОКО**, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать пипетированием. В пробирку ПКВ (положительный контроль выделения) внести 100 мкл компонента **ОКО** и 5 мкл разведенного **ПКО**, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать пипетированием.

8.7 Поместить микропробирки с подготовленными образцами в термостат на 10 мин при температуре 95 °С (допустимо использование кипящей водяной бани). Перенести пробирки в мини-центрифугу-вортекс, центрифугировать 30 сек. Приготовленный раствор РНК немедленно использовать для проведения анализа или хранить не более 5 дней при температуре минус 18-24 °С.

9. Проведение LAMP

Анализ проводят в рабочей зоне 3 согласно МУ 1.3.2569-09.

9.1 Для проведения анализа с использованием набора реагентов **QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96-S** (со стрипированными пробирками) необходим планшетный амплификатор «Термоциклер Т-100» («Bio-Rad», США) с заранее введенной программой 50 °С, 4 мин; 63 °С, 20 мин, 95 °С, 1 мин, температура нагревательной крышки прибора – 95°С.

9.2 Для проведения анализа с использованием набора реагентов **QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96** (индивидуальные микропробирки объемом 0,2 мл) необходимы оптимально 2 твердотельных термостата, способных поддерживать температуру 50 °С (первая инкубация в течение 4 мин) и 63 °С (вторая инкубация в течение 20 мин).

***Внимание!** Сразу после проведения инкубации при температуре 63 °С необходимо резко перемешать пробирки для терминации реакции! Терминация реакции может быть также осуществлена переключением первого термостата с 50 °С на 95 °С и переносом пробирок в этот термостат для инкубации 1 мин 95 °С сразу после инкубации при температуре 63 °С 20 мин). Допустимо использование одного термостата с переключением температуры с 50 °С и 63 °С после первой инкубации.*

9.3 Для проведения выявления РНК SARS-CoV2 в препаратах РНК, приготовленных в соответствии с пунктами 8.1-8.7 или с помощью набора реагентов «РИБО-преп» или «РеалБест Сорбитус (вариант 4x24)», разморозить реагенты **ISO-P** и **ISO-B** при температуре (18-37 °С), аккуратно перемешать и осадить капли с крышки кратким центрифугированием в течение 3 сек.

***Внимание!** Неиспользованные и вскрытые компоненты хранить при температуре от -15 до -25 °С в течение срока годности набора реагентов. Не допускайте более 6 циклов размораживания/замораживания реагентов. При необходимости разликвотируйте реагенты в стерильные пробирки 0,5-1,5 мл меньшими объемами.*

9.4 Расчет реакционной смеси для проведения LAMP

9.4.1 Взять и промаркировать необходимое количество стрипованных микропробирок или отдельных микропробирок объемом 0,2 мл (в зависимости от используемой комплектации набора), равное суммарному количеству клинических образцов плюс **ПКО** и **ОКО** в случае выделения РНК с помощью наборов «РИБО-преп» или «РеалБест Сорбитус (вариант 4x24)». В случае выделения РНК из образцов с помощью реагента **NA-FAST** из набора Комплекта №1 или Комплекта №2 - суммарному количеству клинических образцов плюс **ПКВ** и **ОКВ**.

9.4.2 В отдельной пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь (РС).

9.4.3 Расчет количества реагентов приведен в Таблице 3, для тестирования клинических образцов ($N+2+X$), где N – число образцов для проведения анализа (2 пробирки используются в качестве контрольных, $X=1$ – дополнительный объем для компенсации ошибок пипетирования при использовании до 30 клинических образцов; $X=2$ – от 31 до 60 образцов, $X=3$ – от 61 до 94 образцов):

Количество реагентов

Таблица 3

Наименование реагента	Объем реагента, мкл			
	на один образец (без учета постановки ПКО/ОКО)	на 2-30 образцов	на 31-60 образцов	на 61-94 образца
1 ISO-P	2,5	$(N+3) \times 2,5$	$(N+4) \times 2,5$	$(N+5) \times 2,5$
2 ISO-B	12,0	$(N+3) \times 12,0$	$(N+4) \times 12,0$	$(N+5) \times 12,0$
3 ISO-E	0,5	$(N+3) \times 0,5$	$(N+4) \times 0,5$	$(N+5) \times 0,5$

Внимание! Реагент **ISO-E** содержит глицерин и имеет значительную вязкость. Не погружайте наконечник глубоко в раствор, отбирайте и выдавливайте раствор медленно. Это обеспечит необходимую точность. Реагент **ISO-E** после использования немедленно поместить на хранение в морозильную камеру при температуре от -15 до -25 °C.

Пример расчета необходимого количества реагентов для тестирования 6 клинических образцов:

$$N = 6 + 2 + 1 = 9 \text{ (6 образцов + 1 ПКО + 1 ОКО + 1)}$$

$$(6 + 2 + 1) \times 2,5 \text{ мкл} = 22,5 \text{ мкл (ISO-P)}$$

$$(6 + 2 + 1) \times 12,0 \text{ мкл} = 108 \text{ мкл (ISO-B)}$$

$$(6 + 2 + 1) \times 0,5 \text{ мкл} = 4,5 \text{ мкл (ISO-E)}$$

135 мкл - объем РС

9.4.4 Перенести по 15 мкл РС в ряд пробирок для анализируемых образцов (АО), ПКО и ОКО согласно схеме Рис. 1:

АО						ОКО	ПКО
РС	РС	РС	РС	РС	РС	РС	РС
1	2	3	4	5	6	7	8

Рис. 1. Пример схемы внесения РС в лунки микропробирок для тестирования 6 клинических образцов.

9.4.5 Затем внести по 10 мкл РНК анализируемых образцов в 6 микропробирок. Из реагентов ОКО и ПКО внести по 10 мкл в микропробирки для ОКВ и ПКВ соответственно (см. Рис. 2). Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

АО						ОКВ	ПКВ
PC+ PHK1	PC+ PHK2	PC+ PHK3	PC+ PHK4	PC+ PHK5	PC+C	PC+ОКО	PC+ПКО
1	2	3	4	5	6	7	8

Рис. 2. Пример схемы внесения образцов РНК, ПКО и ОКО в лунки микропробирок для тестирования 6 клинических образцов.

9.4.6 Аккуратно закрыть микропробирки крышками. Центрифугировать на мини-центрифуге стрипованные микропробирки или микропробирки, удостоверившись в падении капель реагентов на дно, краситель при этом должен остаться на крышках. Немедленно поместить пробирки в термостат или амплификатор в зависимости от типа комплектации Набора реагентов.

9.4.7 Для проведения анализа с использованием набора реагентов «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96-S» (со стрипованными пробирками) немедленно поместить стрипы в планшетный амплификатор «Термоциклер Т-100» («Bio-Rad», США) и запустить программу 50 °С, 4 мин; 63 °С, 20 мин, 95 °С, 1 мин, температура нагревательной крышки прибора – 95 °С.

9.4.8 Для проведения анализа с использованием набора реагентов «QB-ISO-COLOR-SARS-CoV-2-96» с красителем немедленно поставить пробирки в термостат типа «ТДВ-120» с термоблоком А-103 («Biosan», Латвия) с температурой 50 °С на 4 мин. Через 10 мин переставить микропробирки в заранее подготовленный твердотельный термостат, нагретый до температуры 63 °С и выдержать 20 мин.

Внимание! Микропробирки инкубировать не дольше указанного времени. При увеличении времени проведения анализа могут накапливаться неспецифические продукты амплификации, что может привести к ложноположительному результату! Терминация реакции может быть также осуществлена переключением первого термостата с 50 °С на 95 °С и переносом пробирок в этот термостат для инкубации 1 мин 95 °С сразу после инкубации при 63 °С 20 мин.

9.4.9 После окончания инкубации немедленно достать все микропробирки, перевернуть и перемешать содержимое микропробирок резким встряхиванием для растворения красителя, высушенного на крышках, и терминации реакции. В результате полного растворения красителя содержимое пробирок должно приобрести оранжевый или зеленый цвет.

Внимание! Микропробирки с отдельными крышками или крышки для стрипованных микропробирок следует хранить в закрытом фольгированном пакете, избегая попадания любого света.

10. Учет и интерпретация результатов LAMP

10.1 Оценку результатов провести в сравнении с цветовым тестом (бумажный вкладыш («цветовой тест») поставляется совместно с набором реагентов, см. п. 18), поместив микропробирки на белую бумагу.

10.2 Визуально проанализировать окраску анализируемых образцов с контрольными, согласно Таблице 5:

Таблица 5

Наименование образца	Цвет до проведения анализа	Цвет при наличии РНК	Цвет при отсутствии РНК
Анализируемый	бесцветный	зеленый или желто-зеленый	оранжевый
ПКО	бесцветный	зеленый или желто-зеленый	-
ОКО	бесцветный	-	оранжевый

- анализируемый образец является положительным (содержащим РНК SARS-CoV-2), если меняется окраска реакционной смеси на зеленый или желто-зеленый цвет;
- анализируемый образец является отрицательным (не содержащим РНК SARS-CoV-2), если меняется окраска реакционной смеси на оранжевый цвет;
- окраска ОКО должна меняться на оранжевый цвет;
- если окраска ОКО поменялась на зеленый или желто-зеленый цвет, то это результат контаминации, постановку реакции следует повторить;
- окраска ПКО должна меняться на зеленый или желто-зеленый цвет;
- если окраска ПКО поменялась на оранжевый цвет или другой, то постановку реакции следует повторить.

Внимание! В случае получения сомнительного результата (промежуточный цвет пробирки, который не может быть однозначно классифицирован в соответствии с цветовой палитрой) необходимо провести повторный анализ соответствующей пробы клинического материала, начиная с этапа подготовки анализируемого образца из проб клинического материала (технический повтор). В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительными рекомендовать повторное взятие материала для анализа (биологический повтор).

11. Контроль качества

Контроль качества набора реагентов при изготовлении осуществляет отдел биотехнологического контроля ООО «СЛТ» согласно ТУ 21.20.23-001-01538629-2021.

12. Ограничения по использованию

12.1 Для получения корректных результатов необходимо строго следовать настоящей инструкции;

12.2 Следует использовать только **реагенты**, входящие в состав набора;

12.3 Не использовать компоненты наборов разных партий;

12.4 Не использовать по истечении срока хранения.

12.5 Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала, указанные в разделе 7 «Материал для исследования». Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции нуклеиновых кислот.

12.6 Не интерпретировать результат анализа специалистами, имеющими дальтонизм (**цветовую слепоту**) - врожденное или приобретенное нарушение зрения, которое проявляется в неспособности глаза различать один или несколько основных цветов.

13. Хранение, транспортировка и утилизация

13.1 Условия хранения

Набор реагентов необходимо хранить при температуре от -15 до -25 °С и влажности от 10...95 % в месте, не допускающем проникновения света (в морозильных камерах).

Специальные требования к способу складированию наборов реагентов отсутствуют.

Срок годности набора реагентов составляет 6 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

13.2 Условия транспортирования

Температура окружающей среды при транспортировании набора реагентов должна быть не выше минус 15 °С, влажность - от 10 до 95 %.

Набор реагентов должен перевозиться с красными термоблоками, содержащие хладоэлементы ХТЛ-4 (ООО «Термологика») или аналогичные.

Воздушным, железнодорожным, морским, автомобильным видами транспорта не более 3 дней.

При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность компонентов набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

Внимание! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «СЛТ» (см. раздел 15).

13.3 Условия утилизации

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов «А» и «Б», которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы относятся к классу «Б» и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

Упаковка набора реагентов (коробки) после использования по назначению относится к отходам класса «А» и утилизируется с бытовыми отходами.

14. Гарантии производителя и сведения о рекламациях

14.1 Производитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

14.2 Срок годности набора – 6 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

14.3 Безопасность и качество набора реагентов гарантируется в течение всего срока годности.

14.4 С техническими вопросами, касающимся качества набора реагентов, а также в случае изменения аналитических характеристик следует обращаться: 630559, Россия, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 1; тел: +7 (383)-309-2000 или 8 (800)-100-5-777; e-mail: mcslt@mail.ru.

14.5 При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, ив уполномоченную государственную регулирующую организацию (Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) согласно действующего законодательства.

15. Производитель

Общество с ограниченной ответственностью «Современные лабораторные технологии», Российская Федерация, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 1; тел: +7 (383)-309-2000 или 8 (800)-100-5-777; e-mail: mcslt@mail.ru.

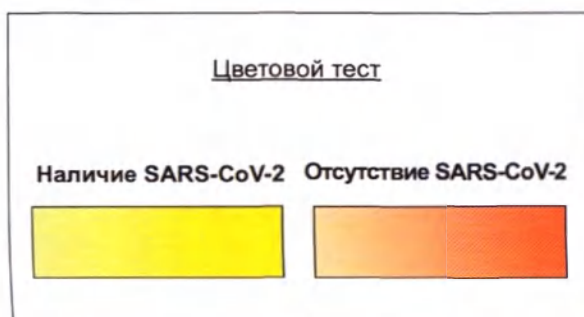
16. Разработчик

«Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт химической биологии и фундаментальной медицины сибирского отделения российской академии наук», Российская Федерация (ИХБФМ СО РАН), Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8; тел. +7 (383) 363-51-70; веб сайт: www.niboch.nsc.ru.

17. Символы, применяемые для маркировки компонентов набора реагентов

	Адрес производителя		Номер серии
	Для диагностики in vitro		Каталожный номер
	Дата изготовления		Количество реакций
	Срок годности		Беречь от влаги
	Перед использованием ознакомиться с инструкцией		Условия хранения
	Не допускать воздействия солнечного света		Не использовать при поврежденной упаковке

18. Цветовой тест



Пронумеровано, прошнуровано и
скреплено печатью

16 (шестнадцать)

листа(ов)

Зав. канцелярией ИХБФМ СО РАН

И.В. Хасанова

