Intifica

Интифика - наборы для молекулярных исследований

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Польщев Д.Г.
«__» _____ 2022 г.

"Компания "Алкор Био" "Alkor Bio Company" Ltd. Санкт-Петербург

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *in vitro* НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК КОРОНАВИРУСА *SARS-CoV-2* В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР «Интифика *SARS-CoV-2*-mono»

Интифика *SARS-CoV-2*-mono	**Комплектация F**	**кат. № 472-11**
Интифика *SARS-CoV-2*-mono	**Комплектация S**	**кат. № 472-12**
Интифика *SARS-CoV-2*-mono	**Комплектация T**	**кат. № 472-13**

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

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

1.2. Функциональное назначение набора «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» – диагностика коронавирусной инфекции (выявление РНК коронавируса *SARS-CoV-2)*.

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

1.3. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

1.4. Набор «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» предназначен только для диагностики *in vitro*, для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

выполнения диагностических исследований *in vitro* в результате специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим или средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КДЛ, врач-бактериолог, биолог, медицинский лабораторный техник, медицинский технолог). Персонал, проводящий исследования с использованием данного МИ, должен владеть навыками проведения молекулярно-биологических исследований и работы на соответствующем оборудовании.

1.5. Набор «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

1.6. Набор «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» предназначен для однократного применения.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-562-98539446-2020.

2.1. Состав набора

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

Набор выпускается в трех вариантах исполнения:

Кат. №	Вариант исполнения	Состав	Количество/объем
472-11	Комплектация F	1.ПЦР-смесь-mono-*SC2* 2.Ферменты (Taq + RT) 3.ПКО – положительный контрольный образец 4.Вода без нуклеаз	1 пробирка (1240 мкл) 1 пробирка (620 мкл) 1 пробирка (лиофилизат) 1 пробирка (250 мкл)
472-12	Комплектация S	1.ПЦР-смесь-mono-*SC2* 2.Ферменты (Taq + RT) 3.ПКО – положительный контрольный образец 4.Вода без нуклеаз	14 стрипов по 8 микропробирок (по 10 мкл) 1 пробирка (620 мкл) 1 пробирка (лиофилизат) 1 пробирка (250 мкл)
472-13	Комплектация T	1.ПЦР-смесь-mono-*SC2* 2.Ферменты (Taq + RT) 3.ПКО – положительный контрольный образец 4.Вода без нуклеаз	112 отдельных микропробирок (по 10 мкл) 1 пробирка (620 мкл) 1 пробирка (лиофилизат) 1 пробирка (250 мкл)

Комплектация F – реакционная смесь мастер-микс, не расфасованная по индивидуальным микропробиркам. Требует предварительного смешивания с ферментами.

Комплектация S – реакционная смесь, запечатанная слоем парафина и расфасованная в 14 стрипов по 8 микропробирок. Требует внесения фермента перед постановкой. Предназначена для амплификаторов планшетного типа совместимых с низкопрофильными ПЦР пробирками.

Комплектация T – реакционная смесь, запечатанная слоем парафина и

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

расфасованная в 112 микропробирок. Требует внесения фермента перед постановкой. Предназначена для амплификаторов роторного типа и амплификаторов планшетного типа, в том числе не совместимых с низкопрофильными ПЦР-пробирками.

Все реагенты за исключением ПКО в составе набора готовы к применению. Лиофилизированный ПКО перед первым использованием необходимо восстановить (см. п. 7.1.1). Вода без нуклеаз для восстановления лиофилизированного ПКО входит в состав набора.

Набор рассчитан на проведение анализа 112 образцов, включая контрольные реакции[1]:

• Положительный контроль К+ – реакция с ПКО, позволяет оценить прохождение этапов ревертирования и ПЦР. ПКО входит в состав набора и содержит синтезированную выявляемую последовательность РНК вируса[2].

• Отрицательный контроль К- – реакция с ОКО после экстракции НК позволяет оценить присутствие контаминации в ПЦР-исследовании и исключить ложноположительные результаты. ОКО входит в состав набора и не содержит специфической НК.

Контрольные реакции должны быть включены в каждое ПЦР-исследование.

Внутренний контроль.

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

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

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

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

---

[1] Контрольные реакции (положительный контроль К+ и отрицательный контроль К-) должны быть включены в каждое ПЦР-исследование

[2] Производится с использованием геномных РНК *SARS-CoV-2* (контрольные образцы 1-го порядка), встроенных в плазмиду PUC19. Последовательность ПКО специфична мишени гена *ORF1ab SARS-CoV-2*. Для КО1 подтверждена видовая принадлежность методом секвенирования и проведена оценка концентрации методом цифровой капельной ПЦР

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Во вкладыше к набору указаны пороговые значения Cq [3] для проб РНК и контрольных реакций: Cq*SC2*, CqПК и CqВК[4], что позволяет оценить достоверность результатов ПЦР-исследования.

Граничные значения пороговых циклов: для Cq*SC2* ≤ 45, для CqПК и CqВК ≤ 35. Точные значения определяют в ходе аттестации серии набора и указывают во вкладыше к набору для валидированных амплификаторов[5].

2.2. Принцип метода

Принцип действия набора реагентов «Интифика *SARS-CoV-2-mono*» основан на методе ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, объединенной с реакцией обратной транскрипции, для выявления специфического участка-мишени РНК-генома коронавируса *SARS-CoV-2*.

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)[6] при выделении РНК из мазков из носоглотки и/или ротоглотки, слюны, бронхоальвеолярного лаважа составляет 500 ГЭ[7]/мл *SARS-CoV-2* в образце[8].

3.2. Аналитическая специфичность

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

Набор обеспечивает отсутствие неспецифических реакций при тестировании

---

[3]Cq - общее обозначение цикла амплификации, соответствующего характеристической точке графика флуоресценции (соответствует Ct, Cp)

[4]Пороговые значения Cq при амплификации фрагмента генома вируса *SARS-CoV-2*, а также ПКО и эндогенного ВК, соответственно

[5]Программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени: CFX96 (ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016), ДТ прайм (ФСР 2011/10229 от 03.03.2011), Rotor-Gene Q (ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010), LightCycler 96 (РЗН 2014/1614 от 22.07.2019), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РЗН 2019/8446 от 6.06.2019)

[6] Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) - минимальная детектируемая концентрация ДНК инфекционного агента в исследуемом образце

[7] ГЭ – суммарное количество генетического материала в 1 клетке

[8] Значение определено при использовании набора реагентов для выделения НК «Преп-НК-Био» производства ООО «Компания Алкор Био» (объем элюции 100 мкл), а также других наборов для экстракции НК, рекомендуемых ООО «Компания Алкор Био»

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

образцов НК человека, а также следующих микроорганизмов: *MERS-coronavirus, Adenovirus (e.g. C1 Ad. 71), Human Metapneumovirus (hMPV), Parainfluenza virus1-4, Influenza virus A, Influenza virus B, Respiratory syncytial virus, Rhinovirus, Legionella pneumophila, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus.*

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

Аналитическая специфичность набора подтверждена:

- *in silico* методом выравнивания последовательностей специфических участков с геномами человека, домашних животных, микроорганизмов, составляющих микрофлору ротовой полости, носоглотки и нижних дыхательных путей человека, а также всех вышеперечисленных близкородственных и других возбудителей респираторных инфекций.
- *in vitro* с использованием Контрольного отрицательного образца специфичности *SARS-CoV-2* (КОС *SC2*), созданного на основе НК *Adenovirus (e.g. C1 Ad. 71), Human Metapneumovirus (hMPV), Parainfluenza virus1-4, Influenza virus A, Influenza virus B, Respiratory syncytial virus, Rhinovirus, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus* в концентрации 10^8 ГЭ/мл (производитель ООО «Компания Алкор Био»).
- при исследовании 83 образцов, полученных от пациентов с подтвержденным наличием вышеперечисленных инфекций.

3.3. Диагностические характеристики

В ходе клинических испытаний Набора реагентов для качественного определения РНК коронавируса *SARS-CoV-2* в клинических образцах методом ОТ-ПЦР «Интифика *SARS-CoV-2*-mono», производства ООО «Компания Алкор Био», Россия, было проведено исследование 996 клинических образцов, взятых у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания с подозрением на инфекцию COVID-19, а также у лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний и не являющихся контактными с больными COVID-2019, включая:

– мазки из ротоглотки (208),
– мазки из носоглотки (212),
– объединенные мазки из носоглотки и ротоглотки (228),
– образцы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) (162),
– образцы слюны (186).

Показатели диагностических характеристик, согласно результатам клинических испытаний, соответствуют значениям, приведенным в таблице (доверительная

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

вероятность, в данном исследовании принята равной 95%).

Клинический материал	Исследуемая НК	Число образцов с истинно положительными результатами анализа		Число образцов с истинно отрицательными результатами анализа		Клиническая (диагностическая) чувствительность	Клиническая (диагностическая) чувствительность
Мазки из ротоглотки	РНК *SARS-CoV-2*	338	108	310	100	100% (95% ДИ: 99,12-100%)	100% (95% ДИ: 99,04-100%)
Мазки из носоглотки			110		102		
Мазки из ротоглотки и носоглотки			120		108		
БАЛ		82		80		100% (95% ДИ:96,41 – 100%)	100% (95% ДИ:96,32 – 100%;)
Слюна		98		88		100% (95% ДИ:96,99 – 100%)	100% (95% ДИ:96,32– 100%;)

3.4. Прецизионность измерения

Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» составляет 100 % и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на заявленных амплификаторах, разных сериях и вариантах исполнения набора (внутрисерийная, межсерийная и внутрипостановочная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения Cq по соответствующим каналам флуоресценции для одного и того же образца не превышает 8%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

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

4.3. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21.

4.4. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007.

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

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

с включенным ламинарным потоком.

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

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

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

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

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

4.12. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.

4.13. Все использованные одноразовые материалы, остатки образцов биоматериала, образующиеся в клинико-диагностических лабораториях, относятся к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) и должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 287-113.

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

4.15. Внимание! В состав компонентов МИ входит 0,05 % азид натрия. Избегайте попадания в глаза и на кожу, опасно при проглатывании. При попадании в глаза – промыть водой, при попадании на кожу – смыть большим количеством воды, при попадании в желудок – прополоскать рот водой. Получить консультацию у врача.

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ПЦР бокс;
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, имеющий каналы FAM, HEX: CFX96 (ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016), ДТпрайм (ФСР 2011/10229 от 03.03.2011), Rotor-Gene Q (ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010), LightCycler 96 (РЗН 2014/1614 от 22.07.2019), Applied

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Biosystems QuantStudio 5 (РЗН 2019/8446 от 6.06.2019);

- мини-центрифуга с модулем вортекса со скоростью вращения 2400 об/мин;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: от 0,5 до 10 мкл, от 10 до 100 мкл, от 100 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования, погрешность не более 3 %;
- штативы для микропробирок объемом 0,1-0,2 мл;
- штативы для пробирок объемом 1,5 и 2 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру +2…+8 °С;
- отдельные халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ (или соответствующие ГОСТ Р 52239-2004);
- емкость с дезинфицирующим раствором.

6. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

6.1. Материалом для исследования являются препараты нуклеиновых кислот, полученные из клинических образцов мазков из носоглотки и/или ротоглотки, слюны, бронхоальвеолярного лаважа.

6.2. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биоматериала необходимо осуществлять согласно МУ 1.3.2569-09, СП 1.2.036-95 и Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

На сопровождающем формуляре необходимо указать наименование подозреваемой острой респираторной инфекции, предварительно уведомив лабораторию о том, какой образец транспортируется. Транспортирование осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре +2…+8 °С.

6.3. Взятие биоматериала

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зонд-тампонами [9] вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки, аккуратно прижимая язык пациента шпателем. После забора материала рабочую часть зонд-тампона помещают в пробирку с транспортной средой, отломив зонд-тампон в области насечки (если имеется) и оставляют его в пробирке. В случае отсутствия насечки, рабочую часть зонд-тампона погружают в транспортную среду, и прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращают зонд 5-10 секунд, после чего зонд-тампон удаляют, предварительно отжав избыток жидкости о стенки пробирки, а

[9] Используемые стерильные зонд-тампоны должны подходить для забора соответствующего типа биоматериала и быть зарегистрированы на территории РФ

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

пробирку плотно закрывают.

ВНИМАНИЕ! Нельзя использовать зонд-тампоны на деревянной основе.

ВНИМАНИЕ! Нельзя касаться зонд-тампоном языка!

Мазки из носоглотки берут сухими стерильными зонд-тампонами вращательными движениями по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд-тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, и удаляют вдоль наружной стенки полости носа, производя вращательные движения. После забора материала рабочую часть зонд-тампона помещают в пробирку с транспортной средой, отломив зонд-тампон в области насечки (если имеется) и оставляют его в пробирке. В случае отсутствия насечки, рабочую часть зонд-тампона погружают в транспортную среду, и прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращают зонд-тампон 5-10 секунд, после чего зонд-тампон удаляют, предварительно отжав избыток жидкости о стенки пробирки, а пробирку плотно закрывают.

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

ВНИМАНИЕ! При помещении зонд-тампона в пробирку нельзя обрезать его рабочую часть ножницами.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зонд-тампонов после забора мазков у пациента помещают в одну пробирку с транспортной средой и исследуют как один образец.

Слюна

Полость рта тщательно прополоскать (10 – 15 секунд) 8-10 мл дистиллированной воды. Жидкость собрать в стерильную центрифужную пробирку объемом 15 мл. Требуется предварительная обработка проб. Биоматериал центрифугировать в течение 3 минут при 3 тыс. об/мин., супернатант отобрать так, чтобы над осадком остался слой водной фракции 0,5 – 1 мл. В пробы внести 0,2 мл транспортной среды, осадок ресуспендировать на вортексе. Полученную суспензию использовать для выделения НК.

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)

Сбор биологического материала для исследования следует проводить до назначения антибиотиков.

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6.4. Хранение и транспортирование образцов необходимо осуществлять с применением транспортных сред, производства ООО «Компания Алкор Био», а также транспортных сред других производителей, рекомендованных ООО «Компания Алкор Био» и в соответствии с инструкцией к набору, используемому для выделения РНК[10].

Набор для выделения РНК	Рекомендуемые транспортные среды
Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС (ФСР 2010/08867 от 13.10.2019)	«Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф» (РЗН 2020/9640 от 14.02.2020)
Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФСР 2008/03147 от 22.02.2019)	Реагент для транспортировки и хранения клинического материала «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ФСР 2009/05011 от 09.04.2019)
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов Реал-Бест Сорбитус (РЗН 2014/1423 от 25.03.2017)	Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор)» (РЗН 2017/6004 от 24.07.2017)
Набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала из биологического материала "МагноПрайм ФАСТ-Р" (РЗН 2020/12971 от 22.12.2020)	Реагент для транспортировки и хранения клинического материала «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ФСР 2009/05011 от 09.04.2019)

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

Клинические образцы, помещенные в транспортную среду в плотно закрытой пробирке можно транспортировать и хранить:

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

6.5. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Наличие интерферирующих веществ в образцах биологического материала (слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты) может быть причиной ингибирования ПЦР и получения сомнительных результатов. Для получения достоверной клинической картины необходимо информировать пациентов о правилах подготовки к ПЦР-исследованию и соблюдать правила взятия биологического материала (см. **п.6.3.**). Для экстракции НК использовать наборы реагентов, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био».

Оценка влияния интерферирующих веществ на эффективность ПЦР с

[10]В случае использования для экстракции РНК наборов других производителей, по вопросам их валидации совместно с наборами серии Интифика следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био»

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

использованием набора «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» показала отсутствие негативного эффекта при наличии в клинических образцах цельной крови – 5 % об., слизи (муцина) – 5 % об., 0,1 % раствора ксилометазолина (в максимальной концентрации 0,002 % в образце), 0,01 % раствора мирамистина (в максимальной концентрации 0,0002 % в образце) при экстракции РНК с помощью комплектов реагентов производства ООО «Компания Алкор Био», предназначенных для соответствующих видов биоматериала и обеспечивающих получение высокоочищенной РНК. В случае использования других наборов для экстракции РНК, зарегистрированных на территории РФ и рекомендованных ООО «Компания Алкор Био» для соответствующего вида биоматериала, интерференции со стороны обычных эндогенных веществ не ожидается.

6.6. Экстракция РНК из клинических образцов

Предобработку биологического материала следует проводить согласно пользовательской инструкции к соответствующему набору для выделения РНК.

Для экстракции РНК из клинических образцов необходимо использовать наборы или комплекты реагентов производства ООО «Компания Алкор Био», а также наборы реагентов других производителей, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био».

Наборы для экстракции РНК, рекомендованные ООО «Компания Алкор Био»: Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС (ФСР 2010/08867 от 13.10.2019), Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФСР 2008/03147 от 22.02.2019), Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов Реал-Бест Сорбитус (РЗН 2014/1423 от 25.03.2017), Набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала из биологического материала "МагноПрайм ФАСТ-Р" по ТУ 21.20.23-088-09286667-2020 (РЗН 2020/12971 от 22.12.2020). При использовании рекомендованных наборов необходимо следовать инструкции от производителя набора.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Ревертирование и амплификация проводятся в одной пробирке.

7.1. Подготовка проб к амплификации:

В зависимости от вида комплектации см. п.7.1.1. или 7.1.2.

7.1.1. Комплектация F

1) Извлечь **ПЦР-смесь-mono-*SC2*** и **Воду без нуклеаз** из морозильной камеры, выдержать при комнатной температуре до полного размораживания. Содержимое пробирок **ПЦР-смесь-mono-*SC2*** и **Вода без нуклеаз** перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

2) Извлечь смесь ферментов **Taq+RT** из морозильной камеры непосредственно перед использованием. Содержимое пробирки **Taq+RT** аккуратно перемешать на

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

3) Отобрать необходимое количество пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл по числу анализируемых образцов и контролей, промаркировать и расположить в штативе.

Внимание! При использовании амплификаторов планшетного типа пробирки следует маркировать на стенках или на выступающих частях крышки, не заходя на прозрачную область для считывания флуоресценции. При использовании амплификаторов роторного типа маркировать пробирки на крышке (считывание производится через стенку пробирки).

4) Приготовить смесь **ММ** для N реакций смешать 10*N мкл **ПЦР-смесь-mono-SC2** и 5*N мкл **Taq+RT.**

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

*Пробирка с **ПЦР-смесь-mono-SC2** содержит смесь для 112 реакций с необходимым запасом. Если требуется проанализировать 112 образцов, то нужно внести в пробирку с **ПЦР-смесь-mono-SC2** 620 мкл **Taq+RT.***

Внимание! Смесь **ММ** подлежит хранению не более часа при +2…+8 °С.

5) В подготовленные пробирки для ПЦР внести по 15 мкл смеси **ММ**.

6) В пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов. Для каждого образца использовать отдельный наконечник.

7) В пробирку, маркированную К-, внести 10 мкл **Воды без нуклеаз**.

8) Извлечь пробирки с лиофилизированным **ПКО** из морозильной или холодильной камеры. Содержимое пробирки с **ПКО** позиционировать на дно коротким центрифугированием. Содержимое пробирки с водой без нуклеаз перемешать на вортексе в течение 1-2 секунд, сбросить капли коротким центрифугированием. Добавить в пробирку с **ПКО** 150 мкл **Воды без нуклеаз**, тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием. В пробирку, маркированную **К+**, внести 10 мкл **ПКО**.

9) Плотно закрыть все ПЦР пробирки, сбросить капли коротким центрифугированием.

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

10) После использования ПКО поместить на хранение при -30…-18 °С в течение 1 месяца или утилизировать согласно **п.11.**

***Примечание:** В случае повторного использования восстановленного **ПКО**: извлечь пробирку с **ПКО** из морозильной камеры (-30...-18 °С), тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.*

7.1.2. Комплектации S и T

1) Извлечь компоненты **ПЦР-смесь-mono-*SC2*, Taq+RT** и **Воду без нуклеаз** из

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

морозильной камеры непосредственно перед использованием. Содержимое пробиркок **Taq+RT** и **Вода без нуклеаз** аккуратно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

2) Отобрать необходимое количество пробирок **ПЦР-смесь-mono-*SC2*** по числу анализируемых образцов, промаркировать и расположить в штативе.

3) Отобрать одну пробирку **ПЦР-смесь-mono-*SC2*** для проведения положительного контроля, промаркировать **К+**, расположить в штативе.

4) Отобрать одну пробирку **ПЦР-смесь-mono-*SC2*** для проведения отрицательного контроля, промаркировать **К-**, расположить в штативе.

5) В каждую пробирку с **ПЦР-смесь-mono-*SC2*** внести по 5 мкл **Taq+RT**, не задевая слой парафина.

6) В пробирку, маркированную **К-**, внести 10 мкл **Воды без нуклеаз**.

7) Внести по 10 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

8) Извлечь пробирки с лиофилизированным **ПКО** из морозильной камеры. Содержимое пробирки с **ПКО** позиционировать на дно коротким центрифугированием. Добавить в пробирку с **ПКО** 150 мкл **Воды без нуклеаз**, тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.

9) В пробирку, маркированную **К+**, внести 10 мкл **ПКО**.

10) Плотно закрыть пробирки, сбросить капли коротким центрифугированием.

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

11) После использования **ПКО** поместить на хранение при -30…-18 °С в течение 1 месяца или утилизировать согласно **п.11.**

Примечание: *В случае повторного использования восстановленного **ПКО**: извлечь пробирку с **ПКО** из морозильной камеры (-30...-18 °С), тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли коротким центрифугированием.*

7.2. Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени

1) Поместить пробирки в амплификатор.

2) Запрограммировать прибор для выполнения программы амплификации «Интифика» с реакцией обратной транскрипции. Подробную информацию см. в «Методических рекомендациях по работе с наборами реагентов серии «Интифика» для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на различных детектирующих амплификаторах» (https://forpcr.ru/info/).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Цикл	Температура, °С	Измерение флуоресценции	Время*	Количество циклов
1	50	-	15 мин (900 с)	1
2	94	-	3 мин (180 с)	1
3	94	-	10 с	5
	60	-	20 с	
4	94	-	10 с	45
	60	HEX/ Yellow/ VIC FAM/ Green	20 с	
* - для некоторых амплификаторов время может быть увеличено в связи с ограничением минимальной продолжительности стадии				

3) Запрограммировать расположение образцов в приборе.

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

5) Выставить объем реакционной смеси 25 мкл.

6) Запустить программу амплификации.

7) По окончании выполнения программы провести анализ результатов.

7.3. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов амплификации производится средствами резидентного программного обеспечения используемого амплификатора в соответствии с пользовательской инструкцией к нему и руководствуясь **«Методическими рекомендациями по работе с наборами реагентов серии «Интифика» для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на различных детектирующих амплификаторах»,** разработанными ООО «Компания Алкор Био».

Оценка результатов проводится по каждому каналу детекции сигнала флуоресценции.

Для реакции К+ с ПКО определены и указаны во вкладыше к набору пороговые значения CqПК по каналу HEX.

Для внутреннего контроля реакции определены и указаны во вкладыше к набору пороговые значения CqВК по каналу детекции флуоресценции FAM.

Для специфической мишени вируса *SARS-CoV-2* определены и указаны во вкладыше к набору пороговые значения CqSC2 по каналу HEX.

7.3.1. Оценка достоверности ПЦР-исследования

Вывод о ***достоверности ПЦР-исследования*** делается, исходя из совокупности оценок амплификации по каналам FAM и HEX в реакциях К+ и К-.

Результаты ПЦР-исследования считаются ***достоверными***, если:

- CqК+ ≤ CqПК по каналу HEX;
- CqК- > CqSC2 по каналу HEX или не определено.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Если для канала HEX определено CqK- менее граничного значения, то это свидетельствует о наличии контаминации. При выявлении контаминации необходимо предпринять меры по локализации и ликвидации её источника.

Только в ***достоверном ПЦР-исследовании*** можно проводить оценку результатов и делать вывод о наличии или отсутствии копий РНК вируса *SARS-CoV-2*.

7.3.2. Оценка результатов ПЦР-исследования

Вывод о наличии копий вируса *SARS-CoV-2* в исследуемом образце делается, исходя из совокупности положительных и отрицательных амплификаций в реакции по каждому каналу детекции флуоресценции.

Амплификация сигнала флуоресценции исследуемого образца по каналу FAM считается ***положительной***, если выполнены следующие условия:

- Cq образца ≤ CqВК по каналу FAM;
- График амплификации флуоресценции по каналу FAM имеет S-образную форму[11];

Амплификация сигнала флуоресценции исследуемого образца по каналу HEX считается ***положительной***, если выполнены следующие условия:

- Cq Образца ≤ Cq*SC2* по каналу HEX;
- График амплификации флуоресценции по каналу HEX имеет S-образную форму.

Если хотя бы одно из условий не выполняется, то амплификация сигнала флуоресценции исследуемого образца по анализируемому каналу принимается как ***отрицательная.***

7.3.3. Положительный результат ПЦР-исследования

Наличие положительной амплификации специфической мишени свидетельствует о присутствии РНК вируса *SARS-CoV-2* в исследуемом образце. В случае отсутствия положительного сигнала по каналу FAM, например, в случаях недостаточного количества эпителиальных клеток или частичной деградации РНК человека в образце при высокой концентрации вируса, рекомендуется повторить забор биоматериала и провести повторное исследование.

7.3.4. Отрицательный результат ПЦР-исследования

При отсутствии положительной амплификации по каналу HEX результат считается отрицательным.

При этом в случае отсутствия положительной амплификации по каналу FAM (ВК) результат считается недостоверным.

7.3.5. Недостоверный результат ПЦР-исследования

При отсутствии положительной амплификации специфической мишени по каналу

---

[11] Для устранения «выбросов» необходимо воспользоваться «Методическими рекомендациями по работе с наборами реагентов серии «Интифика» для ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на различных детектирующих амплификаторах»

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

HEX и эндогенного внутреннего контроля по каналу FAM результат считается недостоверным.

Недостоверный результат ПЦР-исследования свидетельствует о недостаточном качестве образца выделенной НК. Для всех образцов с недостоверным результатом ПЦР-исследования необходимо повторить анализ, начиная с этапа экстракции РНК. При повторном получении недостоверного результата, необходимо исследование образца НК с использованием другого ПЦР-теста.

В случае повторения недостоверного результата ПЦР-исследования рекомендуется принять меры по организации повторного забора материала[12].

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Срок годности набора 12 месяцев.

8.2. Условия хранения компонентов набора «Интифика *SARS-CoV-2*-mono» в течение всего срока годности набора:

Компонент	Условия хранения
ПЦР-смесь-mono-*SC2*	-30…-18 °С
Ферменты (Taq + RT)	-30…-18 °С
ПКО – положительный контрольный образец	-30…+8 °С
Вода без нуклеаз	-30…+8 °С

8.3. Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 5 суток.

8.4. Хранение изделий при температуре +2…+8 °С и при -30…-18 °С должно осуществляться в морозильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

8.5. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

8.6. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

9.1. Транспортирование наборов следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре не выше + 8 °С не более 10 суток.

9.2. Транспортирование изделий должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой, или в авторефрижераторах.

9.3. Допускается краткосрочное (до 5 суток) транспортирование наборов при температуре не выше +25 °С.

9.4. Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима,

[12] Забор материала проводить согласно Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (Covid-19)», утверждённым Минздравом России.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

применению не подлежат.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Гарантийный срок годности набора 12 месяцев от даты производства. Набор не подлежит ремонту и обслуживанию.

11. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

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

11.2. При утилизации отходов необходимо руководствоваться требованиями СанПиН 2.1.3684-21, СанПиН 3.3686-21 и МУ 287-113.

11.3. Класс опасности отходов при применении - Б (эпидемиологически опасные отходы). Отходы класса Б собираются в твёрдую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) жёлтого цвета или имеющие жёлтую маркировку с надписью «Отходы. Класс Б». Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию. Выбор метода обеззараживания определяется возможностями организации, осуществляющей исследования с применением данного набора в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

11.4. После истечения срока годности пачки и пакеты утилизируются как отходы класса А (эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближённые к ТКО).

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

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

11.7. Азид натрия, входящий в состав компонентов МИ, может реагировать с медными, свинцовыми трубами и образовывать металлические азиды с повышенной взрывоопасностью. При утилизации следует смывать растворы большим количеством воды во избежание накопления азида.

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

12. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Содержимого достаточно для проведения n тестов
REF	Номер по каталогу		Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии		Использовать до
	Изготовитель		Предел температур
	Дата изготовления		Не допускать воздействия солнечного света
	Осторожно!		Беречь от влаги
	Биологический риск		

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-562-98539446-2020.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано, скреплено печатью
19 (девятнадцать) лист[ов]
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ Д.Г. Полынцев

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU