ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для качественного определения РНК коронавируса штамма *SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)* методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР»

по ТУ 21.20.23-003-41390295-2020

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

SARS-CoV-2	- коронавирус (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
РНК	- рибонуклеиновая кислота
кДНК	- комлементарная ДНК
ОКО	- отрицательный контроль ПЦР (амплификации)
ПКО-SARS-CoV-2	- положительный контроль ПЦР (амплификации)
Ct	- пороговый цикл
МУ	- методические указания
НК	- нуклеиновая кислота
ОТ-ПЦР-РВ	- реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
СП	- санитарные правила
ГЭ/мл	- геномный эквивалент на миллилитр биоматериала

1. Назначение набора

Назначение. Набор реагентов для качественного определения РНК *коронавируса штамма SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)* методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **«ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР»** по ТУ 21.20.23-003-41390295-2020 предназначен для качественного определения РНК коронавируса *штамма SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)* в пробах НК, выделенных из клинических образцов человека (мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки) методом реакции обратной траскрипции и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Область применения. Клиническая лабораторная диагностика.

Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора - поддержка диагностики коронавируса штамма SARS-CoV-2, скрининг и мониторинг для выявления источника инфекции и оценки эффективности лечения.

Показания к применению. Необходимость определения РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), в биологическом материале человека методом совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Противопоказания. Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

Анализируемыми пробами являются препараты НК, выделенные из клинических образцов (мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки).

Класс в зависимости от степени потенциального риска применения в медицинских целях в соответствии с номенклатурным классификатором медицинских изделий, утвержденным приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06 июня 2012 г. № 4н – 3.

2. Характеристика набора

2.1. 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 производится экстракция РНК SARS-CoV-2, которая 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-меченые олигонуклео-тиды (ДНК-зонды). Данные ДНК-зонды, содержащие флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-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».

Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК проводятся в одной пробирке.

Часть ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (участки гена ORF1, ORF8 и N)* и эндогенного НК внутреннего

контрольного образца (кДНК человека) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

Время анализа составляет 3,5 часа.

2.2. Варианты исполнения набора реагентов

1. «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР-качественный, базовый-50», в составе:

Транспортная среда	0,5 мл	50 шт
«ЛиР» - Лизирующий раствор	30 мл	1 флакон
«РП» Реагент для преципитации	30 мл	2 флакона
«ПР-1» Промывочный раствор №1	25 мл	2 флакона
«ПР-2» Промывочный раствор №2	25 мл	2 флакона
«БР» Буфер для растворения	10 мл	1 флакон

Часть «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР»

ПЦР-смесь-SARS-CoV-2	0,26 мл	1 пробирка
RT PCR ENZ.	0,041 мл	1 пробирка
ПЦР-буфер	0,50 мл	1 пробирка
РНК буфер	0,5 мл	1 пробирка
ПКО-SARS-CoV-2	0,1 мл	1 пробирка
ОКО	1,0 мл	1 пробирка

2. «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР-качественный, базовый-100», в составе:

Транспортная среда	0,5 мл	100 шт
«ЛиР» - Лизирующий раствор	30 мл	1 флакон
«РП» - Реагент для преципитации	30 мл	2 флакона
«ПР-1» - Промывочный раствор №1	25 мл	2 флакона
«ПР-2» - Промывочный раствор №2	25 мл	2 флакона
«БР» - Буфер для растворения	10 мл	1 флакон

Часть «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР»

ПЦР-смесь-SARS-CoV-2	0,53 мл	1 пробирка

RT PCR ENZ.	0,09 мл	1 пробирка
ПЦР-буфер	1,5 мл	1 пробирка
РНК буфер	1,0 мл	1 пробирка
ПКО-SARS-CoV-2	0,2 мл	1 пробирка
ОКО	2,0 мл	1 пробирка

В каждой пробирке одновременно происходит 2 реакции - определение возбудителя и ДНК внутреннего контрольного образца (кДНК человека) в индивидуальной пробирке (см. таблицу 2).

Таблица 2. Регистрация результатов по каналам детекции.

Канал для флуорофора	**ROX**	**Fam**
Длины волн света возбуждение/детекция	585±5 nm / 610±5 nm	470±10 nm / 510±10 nm
НК-мишень	*РНК SARS-CoV-2 (участки гена ORF1, ORF8 и N)*	Эндогенный Внутренний контроль (кДНК человека)

Внимание! В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

3. Характеристики набора реагентов

3.1 Аналитическая чувствительность

Наименьшее число геномных эквивалентов на миллилитр (ГЭ/мл) РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2, определяемых с помощью Набора реагентов «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР» составляет: $1*10^3$ ГЭ/мл коронавируса штамма SARS-CoV-2 в образце НК, прошедшем выделение. Значение порогового цикла (Ct) SARS-CoV-2 $1*10^3$ ГЭ/мл = 29,7+\- 2 цикла

3.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов выявляет наличие фрагментов ДНК из коллекции штаммов.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной НК следующих штаммов: Influenza A virus H1N1, Influenza A virus H1N2, Influenza A virus H3N2, Influenza A virus H6, Influenza A virus H5N1, Influenza A virus H5N2, Influenza A virus H5N3, Influenza A virus H6N2, Influenza A virus H7N1, Influenza A virus H9N2, Avian reovirus (ARV), Avian coronavirus (IBV), Rotavirus A, Human parainfluenza virus type 3 (HPIV-3), Human adenovirus B (HadV-B), Human adenovirus C (HadV-C), Human rhinovirus (HRV), а также геномной ДНК человека в концентрациях $1*10^7$ ГЭ/мл.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов неспецифических реакций выявлено не было. Аналитическая специфичность составила 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность определяют как процент положительных значений в пробах, где НК *коронавируса штамма SARS-CoV-2* присутствует.

Диагностическая чувствительность составила 100% (с доверительной вероятностью 95%).

3.4. Диагностическая специфичность

Диагностическую специфичность определяют как процент отрицательных значений в пробах, где НК *коронавируса штамма SARS-CoV-2* отсутствует.

Диагностическая специфичность составила 100% (с доверительной вероятностью 95%).

3.5. Воспроизводимость

Воспроизводимости определяют на идентичных объектах испытаний, разными операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни.

Стандартное отклонение (SD) не более 0,6.

Коэффициент вариации (CV), не более 5%.

3.6. Повторяемость

Повторяемость определяют на идентичных объектах испытаний, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Стандартное отклонение (SD) не превышает значение 0,5

Коэффициент вариации (CV), не более 5%

3.7. Меры предосторожности

При использовании Набора необходимо использовать средства индивидуальной защиты, например, надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные, возможно содержащие возбудителей любых инфекций.

При работе с Набором реагентов необходимо соблюдать МУ 1.3.2569-09 “Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности”, СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей в соответствии с ГОСТ Р 52905-2007.

Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен

быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в раздельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Внимание. 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.

При работе с Набором соблюдать следующие правила: использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.

Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять набор реагентов строго по назначению.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не открывать пробирки после амплификации, чтобы избежать контаминации в лаборатории.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

В работе необходимо использовать компоненты строго из одной серии Набора реагентов. Запрещается использование отдельных компонентов, относящихся к разным сериям Набора реагентов.

Набор должен применяться согласно Инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения НК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Станция для выделения ДНК/РНК KingFisher Flex
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Axygen», США);

•Перчатки медицинские неопудренные латексные;

•Емкость с дезинфицирующим средством;

•Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;

•Халат лабораторный;

•Набор для выделения НК.

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (имеющий каналы **Orange (оранжевый)** : длина волны 585±5 nm/610±5 nm (флуорофор ROX - РНК SARS-CoV-2*)* и **Green (зеленый):** длина волны 470±10nm/510±10nm (флуорофор Fam – внутренний контроль)).

•ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР - «Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).

•Микроцентрифуга-вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);

•Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл;

•Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).

•Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).

•Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;

•Бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2; 0,5 и 1,5 мл (например, «Axygen», США);

•Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);

•Перчатки медицинские неопудренные латексные;

•Халат лабораторный.

6. Взятие, обработка, транспортирование и хранение исследуемого материала, пробоподготовка.

6.1. Взятие, обработка, транспортирование и хранение исследуемого материала.

Материалом для исследования служат образцы выделенных НК из клинического материала:

- мазки из носа

- отделяемое слизистых оболочек ротоглотки и носоглотки (мазки, соскобы),

При сборе мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды и исследуются как один образец.

Сбор мазков из полости носа.

Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем его вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После забора материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и

транспортировки респираторных мазков.

Сбор мазков из ротоглотки.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой.

После забора материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и

транспортировки респираторных мазков.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С – длительно.

Для контроля эффективности экстракции НК и возможного ингибирования ПЦР в составе Набора реагентов предусмотрено наличие внутреннего контроля ПЦР (кДНК человека). По окончании реакции амплификации наличие сигнала по каналу Fam в исследуемых образцах, свидетельствует о накоплении кДНК человека и говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

6.2. Пробоподготовка.

Содержимое мазков перед экстракцией НК следует перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5-10 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Таблица 3. Рекомендуемые транспортные среды.

Исследуемый материал	Транспортная среда
Мазки из носа, носоглотки и/или ротоглотки	АмплиСенс «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»; АмплиСенс «Транспортная среда для мазков».

7. Проведение анализа

Исследование с помощью Набора реагентов «ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР» состоит из следующих этапов:

- Выделение РНК
- приготовление реакционных смесей;
- подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ;
- проведение ОТ-ПЦР-РВ;
- интерпретация результатов анализа.

7.1 Выделение РНК

Перед постановкой анализа извлечь из холодильной и морозильной камер все компоненты комплекта 1 или комплекта 2 и выдержать все компоненты (кроме «ЛиР»[1] и «РС»[2] для комплекта 2) при температуре (20-25) ºС в течение 30 минут.

П р и м е ч а н и я

Если в «ЛиР» присутствует осадок, то перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65 °С в течение 10 минут (до растворения осадка). Если в «ЛиР» отсутствует осадок, то перед началом работы его необходимо выдержать, как и все компоненты, при температуре (20-25) ºС втечение 30 минут.

Компонент «РС» (комплект 2) извлечь из фольгированного пакета, ножницами отрезать необходимое количество стрипов для постановки анализируемых образцов, с учетом постановки контрольных образцов (расчет количества лунок микропланшета описан в п. 11.3.2.1). Остальные стрипы микропланшета поместить в фольгированный пакет и убрать в морозильную камеру! Стрипы микропланшета для ОТ-ПЦР,

содержащие «РС» выдержать при температуре (20-25) ºС в течение 30 минут, осадить капли со стенок лунок микропланшета, используя вортекс (или в микроцентрифуге в течение 3-5 секунд при частоте вращения 2000 об/мин.).

Размороженная готовая реакционная смесь «РС» хранится при температуре (20-25) ºС в течение 6 часов или при температуре (2-8) ºС в течение 1 суток.

7.1.1 Рассчитать и отобрать необходимое количество пробирок вместимостью 1,5 мл, пронумеровать их и поместить в штатив.

Кол-во пробирок для выделения РНК = кол-во проб клинического материала + 1 (для «ОК»)

Например, для 5 проб клинического материала:

кол-во пробирок для выделения РНК = 5+1=6

Внимание! Всегда использовать «ОК» для контроля процедуры выделения РНК SARS-CoV-2.

7.1.2 Во **все** пробирки внести по 300 мкл «ЛиР», не касаясь наконечником с фильтром краёв пробирки.

7.1.3 Далее в пронумерованные пробирки добавить по 100 мкл проб клинического материала (пронумерованные пробирки); в пробирку с маркировкой «ОК» - 100 мкл «ОК»;

Внимание! *Клинический материал, имеющий осадок, должен быть предварительно гомогенизирован (перемешать на вортексе, капли встряхнуть кратковременным центрифугированием). Каждую пробу клинического материала необходимо отбирать новым наконечником с фильтром!*

7.1.4 Плотно закрыть крышки пробирок, содержимое перемешать на вортексе в течение 5 секунд, затем процентрифугировать в течение 30 сек при частоте вращения 13 000 об/мин. для удаления капель с внутренней поверхности крышки.

7.1.5 Пробирки с пробами выдержать в термостате 10 минут при температуре 65 ºС.

7.1.6 Добавить чистым наконечником с фильтром 600 мкл «РП» и перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 3-5 секунд.

7.1.7 Центрифугировать пробы при 13000 об/мин в течение 5 минут.

7.1.8 Аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость **отдельным** наконечником (без фильтра) из каждой пробирки при помощи дозатора пипеточного или вакуумного аспиратора.

7.1.9 Добавить к осадку 500 мкл «ПР-1» и аккуратно перевернуть пробирку 3-5 раз, не допуская встряхивания.

7.1.10 Центрифугировать пробы при частоте вращения 13000 об/мин в течение 1-2 минут.

7.1.11 Аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость **отдельным** наконечником (без фильтра) из каждой пробирки при помощи дозатора пипеточного или вакуумного аспиратора.

7.1.12 Добавить к осадку 500 мкл «ПР-2», плотно закрыть крышки и аккуратно перевернуть пробирку 3-5 раз, не допуская встряхивания.

7.1.13 Центрифугировать пробы при частоте вращения 13000 об/мин в течение 1-2 минут.

7.1.14 Аккуратно, не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость **отдельным** наконечником (без фильтра) из каждой пробирки при помощи дозатора пипеточного или вакуумного аспиратора.

7.1.15 Открыть крышки пробирок и подсушить образовавшийся осадок при температуре 65 ºС в течение 5 минут.

7.1.16 Добавить к осадку 50 мкл «БР», закрыть крышки пробирок и перемешать на вортексе.

7.1.17 Поместить в термостат при температуре 65°С на 5 мин.

7.1.18 Центрифугировать пробирки при частоте вращения 13000 об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Полученные пробы выделенной РНК SARS-CoV-2 из клинического материала и «ОК» готовы к постановке реакции ОТ-ПЦР.

Внимание! Для обеспечения качества исследования, пробы выделенной РНК рекомендуется хранить не более 30 минут при температуре 2 - 8 °С.

Пробы выделенной РНК могут храниться при температуре не выше минус 20 °С в течение 1 месяца и при температуре не выше минус 70 °С – 1 год.

7.2. Приготовление реакционных смесей

Достать часть набора ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Компоненты Набора реагентов после вскрытия выдерживают 10 циклов размораживания/замораживания, считая с первого использования. Необходимо учитывать данный факт при планировании количества экспериментов с использованием Набора.

ВНИМАНИЕ! Смесь ферментов RT PCR ENZ. рекомендуется извлекать из морозильной камеры непосредственно перед приготовлением реакционных смесей. Осадить капли смеси ферментов с крышки перед использованием кратковременным центрифугированием на вортексе. После внесения RT PCR ENZ. в реакционную смесь, ее следует сразу убрать в морозильную камеру. РЕКОМЕНДУЕМ переносить пробирку с RT PCR ENZ. с использованием штатива-охладителя.

ВНИМАНИЕ! После внесения смеси ферментов RT PCR ENZ. готовые реакционные смеси не подлежат хранению, после использования остатки реакционных смесей должны быть утилизированы.

Разморозить при комнатной температуре (от 18 до 25 ºС) реагенты для амплификации (ПЦР-смесь-SARS-CoV-2, ПЦР-буфер, РНК буфер, ПКО-SARS-CoV-2, ОКО).

7.1.1. Приготовление реакционной смеси комплекты реагентов: «базовый».

В отдельной пробирке смешать компоненты из расчета на каждую реакцию:

- 5 мкл ПЦР-смесь-SARS-CoV-2;
- 10 мкл ПЦР-буфера;
- 0,75 мкл RT PCR ENZ

Перемешать смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.

7.1.2. Приготовление реакционной смеси следует проводить при комнатной температуре от 18 до 25 °С в течение не более 1,5 часов.

Внимание! Реакционную смесь рекомендуется готовить непосредственно перед постановкой. Рекомендуется минимизировать нахождение RT PCR ENZ при температуре выше -18 °С.

7.3. Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ

ВНИМАНИЕ! Компоненты Набора реагентов после вскрытия выдерживают 10 циклов размораживания/замораживания, считая с первого использования. Необходимо учитывать данный факт при планировании количества экспериментов с использованием Набора.

7.2.1. Вариант исполнения «базовый».

Отобрать необходимое количество пробирок для проведения амплификации исследуемых образцов и контролей, промаркировать их.

Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси (п.7.1.1).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл РНК-буфера;

б) в пробирку положительного контроля ПЦР – 10 мкл ПКО-SARS-CoV-2.

в) в остальные пробирки – по 10 мкл исследуемых образцов (включая выделенный образец ОКО).

ВНИМАНИЕ! Если детекция флуорецентного сигнала амплификатором производится через крышки пробирок, в этом случае запрещается маркировать крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ! В случае использования приборов планшетного типа (таких как: «ДТ-96», «CFX96», LightCycler® 96 и прочие) необходимо

осадить капли со стенок пробирок (или плашек) кратким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после добавления исследуемых проб и контролей в реакционные смеси.

7.4. Проведение ОТ-ПЦР-РВ

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя.

Параметры температурно-временного режима амплификации указаны в Таблице 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50ºС – 15 мин	1
2	95ºС – 5 мин	1
3	95ºС – 10 сек	10
	54ºС – 10 сек	
	72ºС – 10 сек	
4	95ºС – 10 сек	30
	56ºС – 10 сек, детекция **ROX(Orange)/Fam(Green)**	
	72ºС – 10 сек	

Учет результатов ПЦР-анализа по всем каналам проводится в соответствии со следующими значениями, представленными в таблице 6:

Таблица 6. Обработка результатов анализа.

Амплификатор	Threshold		Конечный цикл (КЦ)
	ROX (Orange)	Fam (Green)	
Rotor-Gene	0,05	0,05	30

ДТ-96	100	40	30
CFX96	40	30	30
LightCycler® 96	40	30	30

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

7.5. Интерпретация результатов анализа.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца). Подробное описание настроек прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

При проведении качественного ПЦР-анализа используется принцип интерпретации результатов представленный в таблице 7.

Таблица 7. Оценка результатов анализа

Проба	Диапазон Ct по каналу		Результат
	ROX	Fam	
	НК-мишень		
	SARS-CoV-2	Внутренний контроль	
ПКО	от 10 до 27	от 10 до 27	Реакции положительного и внутреннего контролей **прошли успешно**
РНК буфер	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция **прошла успешно**.
	Любое значение	Сигнал отсутствует	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ **повторная постановка**!
	Сигнал	Любое значение	Контаминация

	отсутствует		внутренним контролем! ТРЕБУЕТСЯ **повторная постановка**!
ОКО	Любое значение	Сигнал отсутствует	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ **повторная экстракция**!
	Сигнал отсутствует	Любое значение	Реакция прошла успешно
Проба клинического Образца	Любое значение от 1 до 24	Любое значение	Результат анализа **положительный** *РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2* **обнаружена**
	Сигнал отсутствует Любое значение выше 27	Любое значение	Результат анализа **Отрицательный**
	Любое значение от 1 до 24	Сигнал отсутствует	Результат анализа **Положительный** РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 обнаружена
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
	Любое значение от 24 до 27	Любое значение	ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

ВНИМАНИЕ! Результат ПЦР-анализа считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей амплификации ДНК (ПКО-SARS-CoV-2, РНК буфер) и контроля выделения (ОКО).

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct ROX (Orange) – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор ROX) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct Fam (Green) – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного специфического сигнала или сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор Fam) с пороговой линией.

Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля РНК буфера (на любом из каналов) и для контроля экстракции ОКО (на канале ROX) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

Образец считается положительным (РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 присутствует) если наблюдается экспоненциальный рост сигнала на канале ROX (Orange) и Fam (Green) при этом значения Ct контрольных образцов находятся в пределах нормы. При значениях Ct по каналу ROX (Orange) от 24 до 27 требуется повторное проведение исследования с этапа экстракции. При повторении результата проба считается положительной. При значениях Ct по каналу ROX выше 27 проба считается отрицательной.

Образец считается отрицательным (РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) отсутствует) если не наблюдается рост специфического сигнала на канале ROX (Orange), при этом значения Ct по каналу Fam (Green) и Ct контрольных образцов находятся в пределах нормы.

Образцы, для которых по каналу Fam (Green) значение Ct отсутствует (и при этом по каналу ROX (Orange) отсутствует значение Ct) являются недостоверными и требуют повторного проведения исследования.

Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения Ct для которых лежат в указанном линейном диапазоне.

8. Контаминация

НК инфекционных агентов (коронавируса штамма SARS-CoV-2) не должна выявляться в отрицательном контроле. Присутствие НК инфекционных агентов (коронавируса штамма SARS-CoV-2) в отрицательном контроле указывает на контаминацию другими образцами или ранее амплифицированным продуктом, произошедшую во время приготовления образцов или во время подготовки к проведению исследования.

Для того чтобы избежать контаминации, необходимо произвести полную обработку лаборатории в соответствии с МУ-1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»; затем повторно провести анализ.

9. Контроль качества

Контроль качества Набора при изготовлении осуществляет ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 21.20.23-003-41390295-2020.

10. Условия хранения

После получения набор ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР следует разукомплектовать и хранить в соответствии со следующими требованиями:

Часть ИМБИАН-SARS-CoV-2-ПЦР, а также Протеиназу К (из части «ИМБИАН-FLEX») при температуре от минус 18 до минус 20°С;

Часть «ИМБИАН-FLEX» (кроме Протеиназы К) при температуре от 2 до 25°С в течение всего срока годности набора.

ВНИМАНИЕ! Хранение изделий ниже 0°С должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение светочувствительных изделий должно осуществляться в темном месте.

ВНИМАНИЕ! Во избежание возможной кросс-контаминации при получении Набор реагентов разукомплектовать, Реагенты для амплификации хранить отдельно от Контролей.

11. Условия транспортировки

Транспортирование Набора реагентов производится всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при соблюдении температурного режима.

Для всех вариантов исполнения Набора реагентов допустима транспортировка при температуре от 2 до 8 °С и влажности не более 90% в течение 5 дней (не более).

Для всех вариантов исполнения Набора реагентов допустима транспортировка при температуре от минус 24 до минус 16 °С и влажности не более 90% в течение 30 дней.

Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения "Холодовой цепи", обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Ремонту и обслуживанию не подлежит.

12. Условия эксплуатации

- Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

- Готовая к работе реакционная смесь хранению не подлежит, ее остатки должны быть утилизированы.

- Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-противоэпидемических учреждений.

- Приготовление реакционной смеси следует проводить при комнатной температуре от 18 до 25 °С и влажности 45-75% в течение не более 1,5 часов.

13. Ограничения метода

- ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.

- При возникновении мутаций в исследуемой области генов, может снижаться интенсивность анализируемого сигнала или возникать ложноотрицательные реакции.

- Результаты анализа с использованием Набора реагентов должны интерпретироваться в сочетании с другими клинико-диагностическими и анамнестическими данными.

- Для получения корректного результата важно использовать образцы для анализа на тестирование данных возбудителей до начала приема антибиотикотерапии или после окончания всего курса в случае оценки эффективности лечения.

- Для проведения исследования следует использовать образцы выделенной НК.

14. Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

15. Утилизация.

Медицинские отходы класса Б. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологические отходы следует утилизировать в соответствии со схемой, принятой в организации, в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Утилизация производится специальными организациями, имеющими лицензию на право утилизации медицинских отходов

16. Гарантии изготовителя и сведения о рекламациях

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «ИМБИАН-SARS-CoV-2 IgG/IgM ПЦР», следует обращаться по адресу в Общество с ограниченной ответственностью " Имбиан Лаб " (ООО «Имбиан Лаб»), 630099, Новосибирская область, город Новосибирск, Красный проспект, дом 17/1, тел. 8 (800) 600-90-77, 8 (383) 209-34-54, info@imbian.ru.