

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 11 » *ноября* 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	15
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	16
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
СОСТАВ.....	19
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	21
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	23
А. Подготовка проб для ОТ-ИТ	23
Б. Проведение ОТ-ИТ с детекцией в режиме «реального времени»	24
В. Анализ и интерпретация результатов.....	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	28
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	30
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К–	- отрицательный контроль ОТ-ИТ
ИТ	- изотермическая амплификация
МР	- методические рекомендации
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ИТ	- изотермическая амплификация с обратной транскрипцией
ПК	- положительный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
С+	- положительный контрольный образец
С–	- отрицательный контрольный образец
COVID-19	- Coronavirus disease 2019
ИТ	- isothermal amplification
SARS-CoV-2	- Severe acute respiratory syndrome <i>coronavirus-2</i>
SC2	

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® SARS-CoV-2-ИТ предназначен для качественного определения РНК SARS-CoV-2 в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки) методом обратной транскрипции и изотермической амплификации (ОТ-ИТ) с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для ОТ-ИТ служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого биоматериала. Набор реагентов используется для комплексной лабораторной диагностики COVID-19.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала,

полученного от прибывших из регионов, где регистрируются случаи заболевания COVID-19, лиц, контактировавших с больными COVID-19, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, больных острой респираторной инфекцией при подозрении на COVID-19.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Отрицательный результат исследования не исключает возможность инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2, и может быть получен при содержании вируса в образце ниже заявленной аналитической чувствительности.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала, одновременной обратной транскрипции РНК и изотермической амплификации участков кДНК выявляемого микроорганизма с флуоресцентной детекцией ампликонов.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента обратной транскриптазы. Изотермическая амплификация одного (формы 1, 2, 3) или двух (форма 4) участков кДНК проводится при помощи специфичных к этому участку/участкам праймеров и фермента Bst-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствует флуорофор, связывающийся с двухцепочечными продуктами амплификации, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью термостата с системой детекции в режиме «реального времени».

Амплифицируемая кДНК-мишень и канал детекции флуоресценции указаны в табл. 1.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM
кДНК-мишень	кДНК SARS-CoV-2
Область амплификации (Форма 1, 2, 3)	ген <i>ORF1ab</i>
Область амплификации (Форма 4)	ген <i>ORF1ab</i> , ген <i>E</i>

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «IT-комплект» вариант 200

Форма 2: «РИБО-преп» вариант 100 (2 шт.), «IT-комплект» вариант 200

Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100М (2 шт.), «IT-комплект» вариант 200

Форма 4: «IT-комплект» вариант 200 (SC2)

Формы 1, 4 предназначены для проведения обратной транскрипции РНК и изотермической амплификации кДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК.

Формы 2, 3 предназначены для проведения полного исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы 1, 4 рассчитаны на проведение 200 реакций ОТ-ИТ, включая контроли. Формы 2, 3 рассчитаны на проведение 200 тестов, включая контроли.

Объем контролей во всех формах комплектации рассчитан на 10 независимых постановок.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, ГЭ (копий) / мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«РИБО-преп»	«IT-комплект» вариант 200	1x10 ³
	«МАГНО-сорб» вариант 100М		5x10 ³
	«РИБО-преп»	«IT-комплект» вариант 200 (SC2)	5x10 ³
	«МАГНО-сорб» вариант 100-100М		1x10 ⁴

Примечание – Одна копия мишени кДНК соответствует одному геномному эквиваленту (геному) вируса.

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки РНК коронавируса SARS-CoV-2 (клинические образцы, содержащие РНК SARS-CoV-2 в концентрации не ниже предела обнаружения, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также геномной ДНК человека:

- штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США) в концентрации не более 1x10⁹ ГЭ/мл и не менее 1x10⁵ ГЭ/мл: *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285™, *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 10580™, *Bordetella pertussis* ATCC® 9340™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Candida guilliermondii* ATCC® 6260™, *Candida krusei* ATCC® 14243™, *Clostridium difficile* ATCC® 9689™, *Clostridium septicum* ATCC® 12464™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium minutissimum* ATCC® 23348™, *Corynebacterium xerosis* ATCC® 373™, *Eggerthella lenta* ATCC® 43055™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC® 19414™, *Escherichia coli*

ATCC® 25922™, *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 9006™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25238™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria lactamica* ATCC® 23970™, *Neisseria meningitidis* (serogroup B) ATCC® 13090™, *Peptoniphilus anaerobius* ATCC® 27337™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Propionibacterium acnes* ATCC® 11827™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™, *Rhodococcus equi* ATCC® 6939™, *Salmonella enterica* ATCC® 14028™, *Serratia marcescens* ATCC® 14756™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538 P™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC® 29970™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 49907™, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813™, *Streptococcus equisimilis* ATCC® 12388™, *Streptococcus equi* ATCC® 9528™, *Streptococcus bovis* (group D) ATCC® 9809™, *Streptococcus mutans* ATCC® 35668™, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus salivarius* ATCC® 13419™, *Streptococcus uberis* ATCC® 700407™, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802™, *Vibrio vulnificus* ATCC® 27562™;

- клинические образцы (специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей) в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^5 ГЭ/мл: *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Human adenovirus 1*, *Human rhinovirus*, *Human respiratory syncytial virus*, *Human bocavirus*, *Human parainfluenza virus 3*, *Human parainfluenza virus 4*, *Cytomegalovirus (CMV)*, *Epstein-Barr virus (EBV)*;
- штаммы из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^5 ГЭ/мл: А/Санкт-Петербург /RII-39/2020 (*Influenza virus A (H1N1)pdm09*), А/Калининград/84/2019 (*Influenza virus A (H3N2)*), А/Hong Kong/1073/1999 (*Influenza virus A (H9N2)*), В/Красноярск/09/2020 (*Influenza virus B* линия Виктория), В/Санкт-Петербург/RII-346/2019 (*Influenza virus B* линия

- Ямагата);
- ДНК человека в концентрации 10 мкг/мл.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы содержали стандартный образец предприятия с концентрацией РНК вируса SARS-CoV-2 порядка 10^4 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент С–.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы следующие образцы (см. табл. 4):

Таблица 4

Вид исследуемого материала	Количество образцов
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	320

В качестве референтного метода использовались наборы реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ПУ № РЗН 2014/1987) и АмплиСенс® COVID-19-FL (ПУ № РЗН 2021/145026).

Результаты представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

**Результаты тестирования набора
АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT
в сравнении с референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Всего исследовано 320 образцов	положительных	159	0
		отрицательных	1	160

Таблица 6

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	99,38 (96,57-99,98) %	100 (97,72-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения молекулярного исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности формы 1 и 4 набора реагентов безопасны.

При использовании по назначению форм 2 и 3 набора реагентов и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,

- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов и Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

ВНИМАНИЕ! В процессе ОТ-ИТ образуется больше продуктов амплификации, чем в ПЦР, поэтому требуется особая осторожность при утилизации продуктов ОТ-ИТ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011) или другие, в соответствии с

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

MP 3.1.0117-17 «Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции».

2. Зонд медицинский одноразовый стерильный (например, ООО «ФармМедПолис РТ», Россия (РУ № РЗН 2021/13989)).
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.

Предварительная подготовка исследуемого материала

4. Реагент «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки слизистого материала.
5. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
7. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл.
10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. г.
12. Вортекс.
13. Автоматические дозаторы переменного объема.
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
15. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
16. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

При работе с формами 1 и 4:

17. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или «МАГНО-сорб» вариант 100-100М (РУ № ФСР 2010/07265).
18. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для

экстракции РНК.

При работе с формой 2, включающей комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100:

19. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
20. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
21. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
22. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.
23. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
24. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.
25. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. г.
26. Вортекс.
27. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
28. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
29. Автоматические дозаторы переменного объема.
30. Холодильник от 2 до 8 °С.
31. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
32. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При работе с формой 3, включающей комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100М:

33. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
34. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
35. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 и до 1000 мкл.
36. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл.
37. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
38. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.
39. Вортекс.
40. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.

41. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
42. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
43. Автоматические дозаторы переменного объема.
44. Холодильник от 2 до 8 °С.
45. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
46. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

47. Набор реагентов для экстракции РНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» вариант 100-100М (РУ № ФСР 2010/07265)) - при работе с формами 1, 4.
48. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария (РУ № РЗН 2018/6981)), KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (РУ № ФСЗ 2009/05562)), Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. («Ханчжоу Аошенг Инструментс Ко., Лтд.»), Китай (РУ № РЗН 2022/16430))).
49. Набор расходных материалов к используемой автоматической станции.

Обратная транскрипция и изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

50. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл для приготовления реакционной смеси;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
- в) планшет на 96 лунок или 384 лунки – при использовании прибора планшетного типа на 96 или 384 лунки соответственно;
- г) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene

- объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.
51. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл.
 52. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
 53. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 54. Вортекс.
 55. Автоматические дозаторы переменного объема.
 56. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd. («Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.»), Сингапур (РУ № РЗН 2019/8446))).
 57. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 58. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 59. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки берут двумя зондами в одну пробирку с транспортной средой последовательно: сначала со слизистой оболочки нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, и исследуют как один образец. Не рекомендуется использовать зонды, изготовленные из природных материалов (дерево, вата).

Мазки со слизистой оболочки нижнего носового хода

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется освободить носовые ходы (высморгаться).

Сухой стерильный зонд вводят по боковой стенке носа горизонтально в нижний носовой ход и удаляют вдоль боковой

стенки носа. Глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3-4 см для детей и 5-6 см для взрослых). После взятия материала часть зонда с мазком помещают в пробирку с 0,5-1,0 мл транспортной среды и, придерживая крышкой пробирки, отламывают рукоятку зонда с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Мазок берут сухим стерильным зондом вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала часть зонда с мазком помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку герметично закрывают, встряхивают, чтобы увлажнить оба зонда, и маркируют.

Допускается хранение мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортировка вышеперечисленного материала проводится в условиях соблюдения режимов его хранения.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки **требуют** предварительной подготовки.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Содержимое закрытой пробирки осаждают на вортексе в течение 5 с для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

Если объем образца в пробирке меньше 100 мкл и в пробирке есть зонд, следует добавить физиологический раствор или фосфатный буфер до объема, необходимого для экстракции с учетом возможности повторного анализа образца (100-300 мкл), перемешать и осадить на вортексе в течение 5 с для удаления

капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Если объем образца в пробирке меньше 100 мкл и зонд отсутствует, образец признать непригодным для анализа, биоматериал следует взять повторно.

При наличии в образце слизи в пробу добавляют реагент «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:1, инкубируют при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически помешивая на вортексе в течение 5 мин (до визуального просветления).

В случае наличия нерастворимых включений (осадка) образцы центрифугируют в течение 5 мин при 0,6 тыс. g (например, 3 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия). Для экстракции РНК отбирают 100 мкл надосадочной жидкости.

При необходимости повторного проведения анализа остаток образца замораживают.

Допускается хранение предобработанных образцов мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки до проведения ОТ-ИТ:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, в которых отсутствует зонд для взятия биоматериала и имеющие объем образца меньше необходимого для экстракции.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования.

Были протестированы модельные образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ.

Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 7.

Модельные образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки содержали положительный контрольный образец с концентрацией РНК SARS-CoV-2 порядка 10^4 ГЭ/мл.

Таблица 7

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции	
			«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»
Эндогенные вещества	Кровь цельная	5 %	Не обнаружено	
	Муцин	5 мг/мл	Не обнаружено	
		9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	<u>Не обнаружено</u>
	Гемоглобин	10 мг/мл	Не обнаружено	
	ДНК человека	1 мкг/мл	Не обнаружено	
	ДНК бактериальная	1 мкг/мл	Не обнаружено	
Экзогенные вещества	Физиологический раствор 0,9 %	5 %	Не обнаружено	
	Мирамистин 0,01 %	5 %	Не обнаружено	
	Раствор Люголя с глицерином	5%	Не обнаружено	
	Водный раствор хлоргексидина биглюконата 0,05 %	5 %	Не обнаружено	
	Ксилометазолин 0,1 %	5 %	Не обнаружено	
	Спирт этиловый 70 %	5 %	Не обнаружено	

СОСТАВ

«IT-комплект» вариант 200 – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и изотермической амплификации участка кДНК SARS-CoV-2 – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
IT-mix SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	1,0	1 пробирка
IT-mix-E	Прозрачная жидкость от бесцветного до бледно-желтого цвета	1,0	1 пробирка
C+ IT-SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
C–	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки

Комплект реагентов входит в состав форм 1, 2, 3.

«IT-комплект» вариант 200 (SC2) – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и изотермической амплификации двух участков кДНК SARS-CoV-2 – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
IT-mix-SC2	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	1,0	1 пробирка
IT-mix-E	Прозрачная жидкость от бесцветного до бледно-желтого цвета	1,0	1 пробирка
C+ IT-SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
C–	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки

Комплект реагентов входит в состав формы 4.

«РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ⁵	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

⁴ Допускается выпадение осадка после размораживания.

⁵ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов входит в состав формы 2 в количестве 2 штук.

«МАГНО-сорб» вариант 100М – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого или розового цвета ⁶	107	1 флакон
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	87	1 флакон
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	35	1 флакон
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	14	1 флакон
Магнетизированная силика	Суспензия магнитных частиц	1,0	2 пробирки
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

Комплект реагентов входит в состав формы 3 в количестве 2 штук.

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

⁶ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и изотермическая амплификация кДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

При работе с формами 2 и 3 для экстракции РНК используют комплекты реагентов, входящие в состав набора реагентов:

- при работе с **Формой 2** см. **Приложение 1 «РИБО-преп» вариант 100.**
- при работе с **Формой 3** см. **Приложение 2 «МАГНО-сорб» вариант 100М.**

При работе с формами 1 и 4 для экстракции РНК используют комплекты реагентов «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или «МАГНО-сорб» вариант 100-100М (РУ № ФСР 2010/07265). Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп», «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции. Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁷.

Каждая индивидуальная постановка должна сопровождаться постановкой двух контролей: отрицательного контроля экстракции (**ОК**) и положительного контроля экстракции (**ПК**).

ВНИМАНИЕ! ОТ-ИТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Допускается хранение проб РНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более недели и при температуре не выше минус 68 °С – до года. Допускается однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

⁷ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» вариант 100-100М при работе с формами 1 и 4:

Объем исследуемого образца – **100 мкл.**

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл С–.**

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл С– и 10 мкл С+ IT-SARS-CoV-2.**

Объем элюции «РИБО-преп» – **50 мкл** (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).

Объем элюции «МАГНО-сорб» – **100 мкл.**

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Выбор пробирок для проведения ОТ-ИТ зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для ОТ-ИТ

Общий объем реакционной смеси – 20 мкл, включая объем пробы РНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **5 мкл IT-mix SARS-CoV-2** (или **IT-mix-SC2** при работе с формой 4) и **5 мкл IT-mix-E**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на 2 реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследования.

2. Разморозить и перемешать содержимое пробирки с **IT-mix SARS-CoV-2** (или **IT-mix-SC2** при работе с формой 4), осадить капли на вортексе. Содержимое пробирки **IT-mix-E** перемешать пипетированием, осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Допускается хранение реагентов при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 недель. По истечении указанного срока реагенты не использовать.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **IT-mix SARS-CoV-2** (или **IT-mix-SC2** при работе с формой 4) и **IT-mix-E**. **Тщательно перемешать**, осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! При работе с **IT-mix SARS-CoV-2 / IT-mix-SC2** возможно выпадение осадка после размораживания, который полностью растворяется при нагревании до комнатной температуры. Перед приготовлением реакционной смеси

необходимо убедиться в отсутствии осадка в пробирке с **IT-mix SARS-CoV-2 / IT-mix-SC2**.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ИТ исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **10 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **С+**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **С–**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию в лаборатории необходима постановка отрицательного контроля ОТ-ИТ (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл С–** (без этапа экстракции).

8. Перемешать содержимое пробирок, не допуская появления пены, осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ИТ сразу после соединения реакционной смеси с РНК-пробами и контролями.

Б. Проведение ОТ-ИТ с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по углам реакционного модуля амплификатора.

2. Запустить программу амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала, запрограммировав амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 8 и 9).

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для форм 1, 2, 3

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналу для флуорофора	Количество циклов
1	37	5 мин	—	1
2	65	30 с	FAM	50*

* Допускается уменьшить количество циклов до граничного значения для исследуемых образцов, указанного во вкладыше, плюс 2 (например, во вкладыше граничное значение для исследуемых образцов равно 40, допускается установить 42 цикла вместо 50).

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для формы 4 («IT-комплект» вариант 200 (SC2))

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналу для флуорофора	Количество циклов
1	37	5 мин	—	1
2	65	30 с	FAM	40

Примечания:

1. Температурный профиль данных программ является универсальным для тестов с изотермической амплификацией, включая тесты с обратной транскрипцией.
2. При одновременном проведении нескольких тестов допускается задать в программе наибольшее количество циклов амплификации из указанных в инструкциях к используемым наборам реагентов. Флуоресцентные сигналы, соответствующие увеличенному количеству циклов, не учитываются при анализе и интерпретации результатов (см. вкладыш к набору реагентов).

ВНИМАНИЕ! В процессе ОТ-ИТ образуется больше продуктов амплификации, чем в ПЦР, поэтому требуется особая осторожность при утилизации продуктов ОТ-ИТ.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации (см. табл. 10):

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM
Продукт амплификации	кДНК SARS-CoV-2

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции, имеющей экспоненциальный подъем, с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла (C_t).

Анализируют значения пороговых циклов (C_t) образцов относительно граничных значений, указанных во вкладыше к набору реагентов, в соответствии с табл. 11:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM	Результат
отсутствует или определено больше граничного	РНК SARS-CoV-2 НЕ обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	РНК SARS-CoV-2 обнаружена

Контроль качества исследования

Результат исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ИТ в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов исследования

Контроль	Контролируемый этап исследования	Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM
ПК	Экстракция РНК	<u>Определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	отсутствует или больше граничного
К–	ОТ-ИТ	отсутствует или больше граничного

ВНИМАНИЕ! Настройки приборов и граничные значения указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (Ct) отсутствует или превышает граничное. Необходимо повторить исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (Ct) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля ОТ-ИТ (К-) определено значение порогового цикла (Ct) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «IT-комплект» вариант 200 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. IT-mix-E хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «РИБО-преп» вариант 100 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «IT-комплект» вариант 200 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. IT-mix-E хранить в защищенном от света месте.

Форма 3. «МАГНО-сорб» вариант 100М хранить при температуре от 2 до 25 °С. «IT-комплект» вариант 200 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. IT-mix-E хранить в защищенном от света месте.

Форма 4. «IT-комплект» вариант 200 (SC2) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. IT-mix-E хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно!
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» вариант 100.

Экстракция РНК проводится из 100 мкл подготовленных образцов биологического материала.

ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного комплекта реагентов имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Подготовка к процедуре экстракции РНК

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Прогреть **раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
3. Разморозить и перемешать содержимое пробирок с **С+ IT-SARS-CoV-2** и **С-**, осадить капли на вортексе.

Процедура экстракции РНК

1. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции), промаркировать.
2. В каждую пробирку с исследуемыми образцами и контролями экстракции внести по **300 мкл раствора для лизиса**.
3. В пробирки внести по **100 мкл** исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
4. В пробирку положительного контроля (ПК) внести **10 мкл С+ IT-SARS-CoV-2** и **90 мкл С-**.
5. В пробирку отрицательного контроля (ОК) внести **100 мкл С-**.
6. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости на вортексе.
7. Содержимое пробирок прогреть **5 мин** при **65 °С** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
9. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **12 тыс. g** (например, 13,4 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).

10. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
11. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
12. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге **в течение 1-2 мин при 12 тыс. g** на микроцентрифуге.
13. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
14. Аналогично провести одну отмывку, используя **200 мкл раствора для отмывки 4**.
15. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин** для подсушивания осадка.
16. Добавить в пробирки **50 мкл РНК-буфера** (допускается увеличение объема элюции до 100 мкл).
17. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
18. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин при 12 тыс. g**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ИТ, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

Очищенные РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение недели, при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Допускается однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

А. Экстракция РНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100М

Экстракция РНК проводится из 100 мкл подготовленных образцов биологического материала.

Подготовка к процедуре экстракции РНК

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Разморозить и перемешать содержимое пробирок с **С+ IT-SARS-CoV-2** и **С-**, осадить капли на вортексе.

Процедура экстракции РНК

1. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
2. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл Компонента А** и **20 мкл магнетизированной силики**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140
12	130	260
18	190	380
24	250	500

3. Внести в пробирки по **30 мкл** подготовленной смеси компонента А и магнетизированной силики.
4. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **100 мкл исследуемого образца**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
6. Поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого пробирку с лизирующим раствором добавить **10 мкл С+ IT-SARS-CoV-2** и **90 мкл С-**, перемешать на вортексе.
7. Поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл С-**, перемешать на вортексе.

8. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин.** Кратким центрифугированием осадить капли.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин.**
10. По внутренней стенке пробирки осторожно удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 6.**
12. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, а затем осадить капли кратким центрифугированием. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки.
13. Перенести пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**
14. Удалить надосадочную жидкость аналогично п. 10 и перенести пробирки в обычный штатив.
15. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7.**
16. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, а затем осадить капли кратким центрифугированием. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
17. Перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем осторожно удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы.
18. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
19. Добавить **100 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
20. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С** на **5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
21. Осадить капли кратким центрифугированием и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК для проведения ОТ-ИТ осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива. РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ИТ, которую рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

РНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку. Допускается хранение при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение недели, при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Б. Экстракция РНК с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100М

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100М может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁸ (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария), KingFisher Flex (Thermo FS) (Thermo Fisher Scientific, Финляндия)). Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматических станций и с использованием соответствующего протокола экстракции.

ВНИМАНИЕ! Порядок подготовки и использования контрольных образцов описан в разделе «Экстракция РНК из исследуемых образцов».

Объем исследуемых и контрольных образцов экстракции, загружаемых на борт автоматической пипетирующей станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 110 мкл.

Например – объем для исследуемых образцов 110 мкл, для образца ОК – 110 мкл С–, для образца ПК – 99 мкл С– и 11 мкл С+ IT-SARS-CoV-2.

Рекомендуемый объем элюции – 100 мкл.

⁸ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.