

«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

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome *coronavirus*) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome *coronavirus*), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® Cov-Bat-FL»

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	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	21
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	25
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	28
СОСТАВ.....	31
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	35
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ	37
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	37
А. Подготовка проб для амплификации.....	37
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	39
В. Анализ и интерпретация результатов	40
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	45
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	46
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	47
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	48
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	51
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	52

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87-rec	- экзогенный внутренний контрольный образец
ВОЗ	- всемирная организация здравоохранения
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	- желудочно-кишечный тракт
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОРЗ	- острые респираторные заболевания
ОТ	- обратная транскрипция
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
MERS-Cov	- Middle East respiratory syndrome <i>coronavirus</i> (коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром)
SARS-Cov	- Severe acute respiratory syndrome <i>coronavirus</i> (коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром)
SARS-Cov-2	- Severe acute respiratory syndrome <i>coronavirus-2</i> (коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» предназначен для качественного определения и дифференциации РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome *coronavirus*) и SARS-Cov-родственных вирусов (Severe acute respiratory syndrome *coronavirus*, Severe acute respiratory syndrome *coronavirus-2*), в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из

Форма 1: **REF** Н-2241-1-2; Форма 2: **REF** Н-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** Н-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 3 из 52

зева или трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, плазма крови, фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб), аутопсийный материал) и в объектах окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала и прошедшие этап обратной транскрипции.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике.

Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для исследования объектов окружающей среды с целью профилактики коронавирусной инфекции человека.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО STI-87-rec), проведении реакций обратной транскрипции РНК и

амплификации участков кДНК выявляемых микроорганизмов и кДНК ВКО STI-87-rec с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО STI-87-rec позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента ревертазы (MMIV). Затем проводится амплификация участка кДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых кДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех кДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
кДНК-мишень	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2)	кДНК MERS-Cov
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	ORF1ab	область upE

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 6: «РИБО-преп» вариант 100, «РЕВЕРТА-L» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Форма 7: «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F

Примечание – Формы 3, 4, 5 удалены.

Формы 1, 2, 7 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять кДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и обратной транскрипции.

Форма 6 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала и объектов окружающей среды, реакцию обратной транскрипции и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и позволяет выявлять кДНК в качественном формате.

Формы 1, 2 рассчитаны на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 7 рассчитана на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли. Форма 6 рассчитана на проведение 100 тестов, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Характеристики были определены при использовании комплектов для экстракции РНК/ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) и «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265).

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, плазма крови, концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	MERS-Cov	1x10 ³
	SARS-Cov	
	SARS-Cov-2	
Мокрота / аспират из зева или трахеи	MERS-Cov	1x10 ³
	SARS-Cov	
	SARS-Cov-2	5x10 ³
Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)	MERS-Cov	1x10 ³
	SARS-Cov	
	SARS-Cov-2	1x10 ⁴
Аутопсийный материал	MERS-Cov	5x10 ³
	SARS-Cov	
	SARS-Cov-2	

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 коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-CoV и SARS-CoV-родственных вирусов (SARS-CoV, SARS-CoV-2):

- РНК коронавируса MERS-CoV (образец панели «CORONAVIRUS RNA SPECIFICITY PANEL» (Erasmus Medical Center – EMC, Роттердам, Нидерланды)) в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл;
- РНК коронавируса SARS-CoV, штамм HKU39849 (образец панели «CORONAVIRUS RNA SPECIFICITY PANEL» (Erasmus Medical Center – EMC, Роттердам, Нидерланды)) в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл;
- РНК коронавируса SARS-CoV-2 (образец панели The EDX SARS-CoV-2, Flu, RSV Run Controls (Bio-Rad Laboratories, Inc., США)) в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл.

Аналитическую специфичность набора реагентов оценивали при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов, а также геномной ДНК человека:

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США): *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 49619™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Strain Seattle 1945 (ATCC® 25923™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™), *Moraxella catarrhalis* (ATCC® 8193™), *Neisseria mucosa* (ATCC® 19693™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™), *Mycoplasma pneumoniae*, Strain PI 1428 (ATCC® 29085™), *Chlamydomphila pneumoniae*, Strain CM-1 (ATCC® VR-1360™), *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*, Strain Philadelphia 1 (ATCC® 33152™), *Staphylococcus epidermidis*, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™), *Bacillus cereus*, Strain FDA 5 (ATCC® 10702™), *Streptococcus salivarius* (ATCC® 13419™), *Human Respiratory Syncytial Virus*, Strain 9320 (ATCC® VR-955™), *Human Respiratory Syncytial Virus*, Strain A-2 (ATCC® VR-1540™), *Human Parainfluenza Virus 1*, Strain C35 (ATCC® VR-94™), *Human Parainfluenza Virus 2*, Strain Greer (ATCC® VR-92™), *Human Parainfluenza Virus 3*, Strain C243 (ATCC® VR-93™), *Human Rhinovirus 17*, Strain 33342 (ATCC® VR-

Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 7 из 52

- 1663™), *Human Adenovirus 1*, Strain Adenoid 71 (ATCC® VR-1™), *Human Coronavirus*, Strain OC43 (ATCC® VR-1558™), *Human Coronavirus*, Strain 229E (ATCC® VR-740™), *Human Coxsackievirus B1*, Strain Conn-5 (ATCC® VR-28™), *Human Echovirus 4*, Strain Pesascek (ATCC® VR-1734™), *Human Herpesvirus 1*, Strain HF (ATCC® VR-260™), в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;
- штаммы из коллекции ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов): *Haemophilus influenzae* 423, *Streptococcus pyogenes* Dick – I, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* №25, *Proteus mirabilis* 3177, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Escherichia coli* M 17, *Salmonella typhimurium* 79, *Yersinia enterocolitica* 134, *Bordetella pertussis* 703 L 6, *Mycobacterium Bovis Ravenel* №700204 в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;
 - штаммы из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева»: А/Санкт-Петербург/НИИГ-252/19 (*Influenza virus A* (H3N2)), А/Калининград/75/19 (*Influenza virus A* (H1N1)pdm09), В/Washington/02/19 (*Influenza virus B* линия Виктория), В/Якутск/НИИГ-06/2019 (*Influenza virus B* линия Ямагата) в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^7 ГЭ/мл;
 - образец панели «CORONAVIRUS RNA SPECIFICITY PANEL» (Erasmus Medical Center – EMC, Роттердам, Нидерланды): *Human coronavirus*, Strain NL63 в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^6 ГЭ/мл;
 - ДНК человека в концентрации 0,2 мг/мл.

При тестировании образцов РНК/ДНК 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 представляли собой стандартные образцы предприятия, содержащие РНК SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца

Форма 1: **REF** Н-2241-1-2; Форма 2: **REF** Н-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** Н-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 8 из 52

был использован реагент ОКО.

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, %
MERS-Cov	10	100	30	100
SARS-Cov	10	100	30	100
SARS-Cov-2	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

- 1) в качестве образцов, содержащих коронавирус SARS-Cov-2, образцы биологического материала от пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом COVID-19, что было доказано при тестировании набором реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ПУ № РЗН 2021/14026);
- 2) в качестве образцов, содержащих коронавирусы MERS-Cov и SARS-Cov, модельные образцы биологического материала, содержащие рекомбинантные стандартные образцы предприятия;
- 3) в качестве образцов объектов окружающей среды, содержащих РНК SARS-Cov-2, образцы объектов окружающей среды, наличие РНК SARS-Cov-2 в которых было доказано при тестировании набором реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ПУ № РЗН 2021/14026);
- 4) в качестве образцов объектов окружающей среды, содержащих коронавирусы MERS-Cov и SARS-Cov, модельные образцы объектов окружающей среды, содержащие рекомбинантные стандартные образцы предприятия;
- 5) в качестве образцов, не содержащих коронавирусы MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-

Cov-2), образцы биологического материала:

- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки от больных ОРВИ (грипп А и В, парагрипп, аденовирусная инфекция, респираторно-синцитиальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека, вызванная *hCov NL63*, *hCov OC43*, *hCov 229E*, *hCov HKU1*),
- мокрота / аспират из зева или трахеи от больных внебольничной пневмонией (грипп А и В, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*),
- бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов от больных пневмонией, вызванной гриппом А и В, а также больных легионеллезной инфекцией,
- плазма крови от больных аденовирусной инфекцией,
- фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб) от больных ротавирусной инфекцией,
- аутопсийный материал от больных, умерших от гриппа А,
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды), содержащие ДНК микроорганизмов рода Сальмонелла (*Salmonella* spp.) и РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* А).

Отсутствие РНК SARS-Cov-2 в биологических образцах и образцах объектов окружающей среды было доказано при тестировании набором реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ПУ № РЗН 2021/14026). Этиология заболевания для каждого пациента была установлена при тестировании с наборами реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*» (ПУ № ФСР 2009/05010), «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» (ПУ № ФСР 2009/05143) и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ПУ № ФСР 2011/11258), АмплиСенс® Пневмо-квант-FL (ПУ № РЗН 2022/16467), «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» (ПУ № ФСР 2008/02265), «АмплиСенс® *Legionella pneumophila-FL*» (ПУ № ФСР 2010/07097), АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL (ПУ № РЗН 2019/8445), «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (ПУ № ФСР 2012/13998). ДНК микроорганизмов рода Сальмонелла (*Salmonella* spp.) и РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* А) в образцах объектов окружающей среды были

обнаружены набором реагентов «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» (РУ № ФСР 2008/02265).

Образцы объектов окружающей среды получены из референс-центра по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций Роспотребнадзора.

Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Описание образцов	Вид исследуемого материала	Количество образцов
Биологический материал, содержащий РНК SARS-Cov-2	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	250
	Мокрота / аспират из зева или трахеи	150
	Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	70
	Плазма крови	50
	Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)	150
	Аутопсийный материал	150
Биологический материал, содержащий РНК SARS-Cov и РНК MERS-Cov	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	50
	Мокрота / аспират из зева или трахеи	50
	Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	50
	Плазма крови	50
	Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)	50
	Аутопсийный материал	50
Биологический материал, не содержащий РНК SARS-Cov-2, SARS-Cov, MERS-Cov	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	250
	Мокрота / аспират из зева или трахеи	150
	Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	70
	Плазма крови	50
	Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)	150
	Аутопсийный материал	150
Объекты окружающей среды, содержащие РНК SARS-Cov-2	Концентраты образцов воды	50
	Смывы с объектов окружающей среды	
Объекты окружающей среды, содержащие РНК SARS-Cov и РНК MERS-Cov	Концентраты образцов воды	50
	Смывы с объектов окружающей среды	
Объекты окружающей среды, не содержащие РНК SARS-Cov-2, SARS-Cov, MERS-Cov	Концентраты образцов воды	55
	Смывы с объектов окружающей среды	

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® Cov-Bat-FL»**

Микроорганизм	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале, %	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале, %
SARS-Cov-2	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100 (99-100) %	100 (99-100) %
	Мокрота / аспират из зева или трахеи	100 (98-100) %	100 (98-100) %
	Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	100 (95-100) %	100 (95-100) %
	Плазма крови	100 (93-100) %	100 (93-100) %
	Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)	100 (98-100) %	100 (98-100) %
	Аутопсийный материал	100 (98-100) %	100 (98-100) %
	Концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	100 (93-100) %	100 (94-100) %
SARS-Cov, MERS-Cov	Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100 (93-100) %	100 (99-100) %
	Мокрота / аспират из зева или трахеи	100 (93-100) %	100 (98-100) %
	Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	100 (93-100) %	100 (95-100) %
	Плазма крови	100 (93-100) %	100 (93-100) %
	Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)	100 (93-100) %	100 (98-100) %
	Аутопсийный материал	100 (93-100) %	100 (98-100) %
	Концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	100 (93-100) %	100 (94-100) %

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

Форма 1: **REF** Н-2241-1-2; Форма 2: **REF** Н-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** Н-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 12 из 52

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) 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 нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-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,

Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 13 из 52

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, 2 и 7 набора реагентов безопасны.

При использовании по назначению формы 6 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,

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

Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 14 из 52

общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011).
2. 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).
3. Зонд медицинский одноразовый стерильный (например, ООО «ФармМедПолис РТ», Россия (РУ № РЗН 2021/13989), SOPAN Italia S.p.A. («Копан Италия С.п.А.»), Италия (РУ № ФСЗ 2010/07660)).
4. Вакуумная система забора крови типа Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан ГмбХ»), Австрия).
5. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша).
6. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
8. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).

9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
10. Штативы для пробирок объемом 1,5; 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
11. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Предварительная подготовка исследуемого материала

14. Реагент для предобработки образцов, содержащих слизь, «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082).
15. 0,9 % раствор натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0 – для предварительной подготовки секционного материала и фекалий.
16. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
17. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл, до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
20. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
21. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
22. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит

Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).

23. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
24. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
26. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
27. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

При работе с формами комплектации 1, 2 и 7:

28. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
29. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот – при работе с формами комплектации 1, 2 и 7:

30. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)).
31. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК «открытого типа» (например, KingFisher Flex (Termo 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))).
32. Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции.

При работе с формой комплектации 6:

33. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).

34. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
35. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
36. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
37. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
38. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
39. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
40. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
41. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия).
42. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», АО «Ульяновское конструкторское бюро приборостроения», Россия).
43. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
44. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
45. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
46. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Обратная транскрипция

При работе с формами комплектации 1, 2 и 7:

47. Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (ПУ № ФСР 2008/03994).

48. Дополнительные материалы и оборудование для обратной транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для обратной транскрипции.

При работе с формой комплектации 6:

49. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

50. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия) или амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), ДНК-амплификатор S1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториез, Инк.»), США), МахуGene Gradient (Ахуген, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк.»), США)).

51. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).

52. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).

53. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2; 0,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).

54. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 100, до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).

55. Штативы пробирок объемом 0,2; 0,5 мл и наконечников (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).

56. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

57. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

58. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

59. Одноразовые полипропиленовые пробирки – при работе с «ПЦР-комплектами» варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки

- объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) – для приготовления реакционной смеси;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США) – при использовании прибора роторного типа.
60. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
61. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
62. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
63. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
64. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
65. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 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)).

66. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
67. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
68. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Биологический материал

Для исследования от пациента рекомендуется брать не менее двух типов биологического материала (материал из респираторного тракта, плазма крови и, при наличии симптомов поражения ЖКТ, фекалии).

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки,
- мокрота / аспират из зева или трахеи,
- бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов,
- плазма крови,
- фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб),
- аутопсийный материал.

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

Мазки со слизистой оболочки носоглотки. 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 носо- и ротоглотки до проведения предобработки:

- 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.

Мокрота / аспират из зева или трахеи. Образцы собирают и помещают в одноразовые герметичные емкости из полипропилена. Мокроту собирают после предварительного полоскания полости рта водой. Аспират из зева или трахеи получают традиционным способом. Если нет возможности получить мокроту или аспират из зева или трахеи, собирают слюну, образующуюся утром после глубокого откашливания сразу после пробуждения.

Допускается хранение мокроты / аспирата из зева или трахеи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов. Образцы собирают в одноразовые плотно завинчивающиеся емкости из полипропилена объемом не менее 5 мл.

Допускается хранение бронхоальвеолярного лаважа / промывных вод бронхов до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;

– при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Плазма крови. Для получения плазмы взятие крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8–1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с ЭДТА. Закрытую пробирку аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом) и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Не позднее 6 ч с момента взятия крови пробирку с цельной кровью центрифугируют при 0,8–1,6 тыс g в течение 20 мин при комнатной температуре. Полученную плазму отбирают (не захватывая лейкоцитарное кольцо) в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Для экстракции РНК используют 100 мкл образца плазмы.

Допускается хранение плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)

Фекалии. Образцы забирают в стерильный горшок или подкладное судно. Затем в количестве 1 г (примерно) переносят в одноразовую герметичную емкость из полипропилена.

Допускается хранение фекалий до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Фекальный мазок (соскоб). Образцы собирают из подгузника или с поверхности одноразового пакета, положенного в горшок или судно. Сухой стерильный зонд погружают в пробу фекалий, выдерживают до пропитывания, после чего конец зонда отламывают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды (физиологического раствора или фосфатного буфера), придерживая его крышкой пробирки, и герметично закрывают пробирку.

Ректальный мазок (соскоб). Для взятия ректального мазка сухой стерильный зонд вводят в прямую кишку на глубину 2 см, производят вращательное движение и извлекают. Зонд отламывают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды (физиологического раствора или фосфатного буфера), придерживая его крышкой пробирки, и герметично закрывают пробирку.

Допускается хранение фекальных / ректальных мазков (соскобов) до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Аутопсийный материал. Образцы помещают в стерильные одноразовые контейнеры и исследуют в течение 1 ч либо замораживают сразу после взятия.

Допускается хранение аутопсийного материала до проведения предобработки:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 7 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

Объекты окружающей среды

Материалом для исследования служат:

- концентраты образцов воды,

– смывы с объектов окружающей среды.

Концентраты образцов воды. Образцы берут в соответствии с МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» и МУК 4.2.1018-01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» или актуальными версиями данных документов, действующими на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

Смывы с объектов окружающей среды. Образцы берут зондами с тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором. Площадь смыва с плоской поверхности составляет 5-10 см². Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, верхнюю часть зонда отламывают и удаляют.

Допускается хранение образцов объектов окружающей среды до проведения ПЦР-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.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

Транспортировка вышеперечисленного материала проводится в условиях соблюдения режимов его хранения.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Плазма крови, концентраты образцов воды и смывы с объектов окружающей среды не требуют предварительной подготовки.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева или трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб), аутопсийный материал 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. Если уровень жидкости в пробирке ниже отметки 0,5 мл, следует увеличить объем, добавив физиологический раствор до 0,5 мл, перемешать и осадить на вортексе в течение 5 с для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. При наличии в образце слизи в пробу добавляют реагент «МУКОЛИЗИН» до отметки 1 мл, инкубируют при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически помешивая на вортексе в течение 5 мин (до визуального просветления). В случае выпадения осадка образцы центрифугируют в течение 5 мин при 0,6 тыс g (например, 3 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца. При необходимости повторного проведения анализа остаток образца замораживают.

Мокрота / аспират из зева или трахеи. Вязкая по консистенции мокрота / аспират из зева или трахеи подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с образцом добавляется равное количеству образца количество реагента «МУКОЛИЗИН». После инкубации при комнатной температуре до просветления образца (не более 20 минут), 100 мкл образца используют для экстракции РНК. В случае выпадения осадка образец переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 0,6 тыс g (например, 3 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf), 100 мкл супернатанта используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток образца замораживают.

Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов. Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 6,7 тыс g (например, 10 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток образца

замораживают.

Аутопсийный материал. Образец гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков (или гомогенизаторов), затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 6,7 тыс g (например, 10 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

Допускается хранение предобработанных образцов: мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева или трахеи, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 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.

Фекалии / фекальный или ректальный мазок (соскоб)

Фекалии. К образцу фекалий (объемом до 1,0 мл (по 0,4–1,0 г)) добавляют 4,0 мл физиологического раствора до образования 10–20 % суспензии (фекалии водянистой консистенции могут использоваться без приготовления суспензии). Взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии.

Полученную суспензию фекалий осветляют одним из двух способов:

1. Центрифугирование суспензии фекалий в течение 20 мин при 0,6 тыс g (например, 3 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Супернатант (осветленный экстракт фекалий) используют для экстракции РНК.
2. Проведение экспресс-фильтрации суспензии фекалий. Для

экспресс-фильтрации используют два наконечника объемом 1 мл (один с фильтром, другой – без фильтра) и полистироловую палочку с ватным наконечником (например, палочку для ушей). Предварительно следует подготовить систему фильтрации: от ватной палочки отрезается кончик с ватой, который вставляется в наконечник без фильтра и проталкивается с помощью другого чистого наконечника до упора в его суженную часть. Автоматической пипеткой объемом 1 мл с наконечником с фильтром забирается 0,5 мл фекальной суспензии, наконечник с суспензией плотно до упора вставляется в подготовленный наконечник с ватной вставкой. Фильтрация суспензии проводится из наконечника пипетки с фильтром через наконечник с ватной вставкой в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл под давлением поршня пипетки. В случае затруднений при фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию суспензии фекалий. Полученный фильтрат в количестве 50 мкл используют для экстракции РНК.

Фекальный или ректальный мазок (соскоб). Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 мин при 0,6 тыс g (например, 3 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf), 50 мкл супернатанта используют для экстракции РНК.

Допускается хранение предобработанных образцов фекалий / фекальных или ректальных мазков (соскобов):

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 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

Для контроля эффективности экстракции РНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-

рес), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО STI-87-рес, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 6).

Были протестированы отрицательные и положительные модельные образцы биологического материала без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Положительные модельные образцы содержали стандартные образцы предприятия с концентрацией РНК SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV от 5×10^3 до 5×10^4 ГЭ/мл.

Результаты, полученные с помощью комплектов для экстракции «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб», представлены в табл. 6.

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции	
				«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Эндогенные вещества	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	нт
			9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
			Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено
Мокрота / аспират из зева или трахеи	Эндогенные вещества	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	нт
			9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	Не обнаружено
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	Эндогенные вещества	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	нт
			9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	Не обнаружено
		Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
Фекалии / фекальный или ректальный мазок	Эндогенные вещества	Муцин	6 мг/мл	Не обнаружено	нт
			9 мг/мл	<u>Обнаружено</u>	Не обнаружено
		Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
Плазма крови	Эндогенные вещества	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
Аутопсийный материал	Эндогенные вещества	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено

Примечание – «нт» означает, что данную концентрацию не тестировали, так как не было установлено интерференции более высокой концентрации данного вещества при экстракции комплектом реагентов «МАГНО-сорб».

СОСТАВ

«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 ⁴	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

Входит в состав формы комплектации 6.

«РЕВЕРТА-L» вариант 100 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	10 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	10 пробирок
Ревертаза (MMIV)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Входит в состав формы комплектации 6.

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации участков кДНК коронавируса MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета, раскапана под воск	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-А	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

⁴ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Входит в состав формы комплектации 1.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Входит в состав формы комплектации 2.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации участков кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Входит в состав формы комплектации 6.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для амплификации участков кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	2 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	1,1	2 пробирки
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Входит в состав формы комплектации 7.

Реагенты комплектов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, вариант FRT-100 F и вариант FRT-200 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Данные комплекты реагентов состоят из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 33 из 52

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).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используют комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» (при работе с формой комплектации 6 в соответствии с Приложением 1; при работе с формами комплектации 1, 2 и 7 в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции);
- «МАГНО-сорб» применяется совместно с автоматическими станциями «открытого типа»⁵ (при работе с формами комплектации 1, 2 и 7 в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции и с использованием соответствующего протокола экстракции).

Экстракцию РНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца - **ВКО STI-87-rec**. В каждую группу экстрагируемых образцов необходимо включать по одному повтору отрицательного (ОК) и положительного (ПК) контролей. Контроли проходят все этапы ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. ОК позволяет контролировать возможную контаминацию исследуемых образцов; ПК позволяет оценивать корректность прохождения исследования.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Объем ВКО STI-87-rec – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл** подготовленных образцов объектов окружающей среды и биологического

⁵ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 35 из 52

материала за исключением фекалий / фекального или ректального мазка (соскоба). При работе с фекалиями / фекальным или ректальным мазком (соскобом) для экстракции РНК используется подготовленная суспензия, состоящая из 50 мкл ОКО и 50 мкл фекалий / фекального или ректального мазка (соскоба).

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

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) и обратной транскрипции РНК внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**.

Объем элюции – **90 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью автоматических станций с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Объем ВКО STI-87-рес – 10 мкл на один образец.

Объем исследуемого образца – 100 мкл подготовленных образцов объектов окружающей среды и биологического материала за исключением фекалий / фекального или ректального мазка (соскоба). При работе с фекалиями / фекальным или ректальным мазком (соскобом) для экстракции РНК используется подготовленная суспензия, состоящая из 50 мкл ОКО и 50 мкл фекалий / фекального или ректального мазка (соскоба).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используется **100 мкл ОКО**.

В качестве положительного контроля экстракции (ПК) и обратной транскрипции РНК используется **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**.

Объем элюции – 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ 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 только однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

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

Для проведения реакции обратной транскрипции используют комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» (при работе с формой комплектации 6 в соответствии с Приложением 1, при работе с формами комплектации 1, 2 и 7 в соответствии с инструкцией к комплекту для получения кДНК на матрице РНК).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка проб для амплификации

А1. Подготовка проб при использовании «ПЦР-комплект» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных образцов. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-А**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

- б) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из образца **ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**.

ВНИМАНИЕ! При получении новой серии набора реагентов необходима постановка положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+, К–). Постановка К+ рекомендуется для проверки работы амплификаторов и в других случаях внутрилабораторного контроля. Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI**. При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

A2. Подготовка проб при использовании «ПЦР-комплект» варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL MERS-Cov / SARS-Cov, 5 мкл ПЦР-буфера-В и 0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас на несколько реакций (см. Приложение 3).

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov, ПЦР-буфером-В и полимеразой (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL MERS-Cov / SARS-Cov, ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
 - б) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из образца **ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**.

ВНИМАНИЕ! При получении новой серии набора реагентов необходима постановка положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+, К–). Постановка К+ рекомендуется для проверки работы амплификаторов и в других случаях внутрилабораторного контроля. Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI**. При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ⁶			Приборы планшетного типа ⁷				
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов		
1	95	вариант FRT	5 мин	1	95	вариант FRT	5 мин	1
		варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F	15 мин			варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F	15 мин	
2	95	10 с	10	95	10 с	10		
	54	20 с		54	25 с			
	72	10 с		72	25 с			
3	95	10 с	35	95	10 с	35		
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	25 с детекция флуоресц. сигнала			
	72	10 с		72	25 с			

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

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

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

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

⁶ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁷ Например, «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.») и другие, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1: **REF** Н-2241-1-2; Форма 2: **REF** Н-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** Н-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 40 из 52

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам (см. табл. 8):

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2)	кДНК MERS-Cov

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 9:

Таблица 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение C_t по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>определено</u> не более граничного	отсутствует	отсутствует	PHK MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) не обнаружена
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> не более граничного	PHK MERS-Cov обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> не более граничного	определено или отсутствует	PHK SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует	отсутствует	Невалидный*
определено или отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 10 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение C_t по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> не более граничного	отсутствует	отсутствует
ПК	Экстракция, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного	<u>определено</u> не более граничного

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше, интерпретация для ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК):

- а) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофоров JOE и/или ROX (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружен аналит, определяемый по соответствующему каналу (см. табл. 8). Необходимо повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК;

- б) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Интерпретация образцов проводится согласно таблице 9.
2. Для положительного контроля ПЦР (K+):
- а) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофоров JOE и/или ROX (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружен аналит, определяемый по соответствующему каналу (см. табл. 8). Необходимо повторить амплификацию таких образцов;
- б) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Интерпретация образцов проводится согласно таблице 9.

ВНИМАНИЕ!

- при получении правильного результата для ПК (см. табл. 10) интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей 9, вне зависимости от результатов для K+;
 - при получении правильного результата для K+ и ошибке ПК интерпретация результатов возможна только для образцов, в которых обнаружен аналит, определяемый по соответствующему каналу (см. табл. 8). Необходимо повторить ПЦР-исследование образцов, в которых не обнаружен аналит, определяемый по соответствующему каналу (см. табл. 8), начиная с этапа экстракции РНК.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK):
- а) по каналу для флуорофора JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружен аналит, определяемый по соответствующему каналу (см. табл. 8). Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника

- контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции РНК;
- б) по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Интерпретация образцов проводится согласно таблице 9.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (K-):
- а) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE и/или ROX. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружен аналит, определяемый по соответствующему каналу (см. табл. 8). Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов;
- б) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружен аналит, определяемый по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX (см. табл. 8). Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.
5. 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 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. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov хранить в защищенном от света месте.

Форма 2, 7. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F, FRT-200 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-В, ПЦР-смеси-FL MERS-Cov / SARS-Cov и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov хранить в защищенном от света месте.

Форма 6. «РИБО-преп» вариант 100 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «РЕБЕРТА-L» вариант 100 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-В, ПЦР-смеси-FL MERS-Cov / SARS-Cov и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov 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 регулируемую 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.

Порядок работы

Экстракция РНК проводится из **100 мкл** подготовленных образцов объектов окружающей среды и биологического материала за исключением фекалий / фекального или ректального мазка (соскоба). При работе с фекалиями / фекальным или ректальным мазком (соскобом) для экстракции РНК используется подготовленная суспензия, состоящая из 50 мкл ОКО и 50 мкл фекалий.

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

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-rec**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-rec** внести по **100 мкл** подготовленных проб (за исключением фекалий / фекального или ректального мазка (соскоба)), для каждой пробы использовать отдельный наконечник с фильтром. При работе с фекалиями / фекальным или ректальным мазком (соскобом) в пробирки с раствором для лизиса и ВКО STI-87-rec внести по 50 мкл образца биоматериала и 50 мкл ОКО. В пробирку отрицательного контроля (ОК) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКO MERS-Cov / SARS-Cov**.
4. Закрывать крышки, содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней

- поверхности крышки. Прогреть **5 мин** при **65 °C** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
 6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **12 тыс g** (например, 13,4 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
 7. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 8. 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.
 9. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1-2 мин** при **12 тыс g**.
 10. Осторожно, не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
 12. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1-2 мин** при **12 тыс g**.
 13. Осторожно, не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 14. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка.
 15. Добавить в пробирки **90 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
 16. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит

очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке ОТ, 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

Обратная транскрипция РНК с использованием комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L»

Общий объем реакции – 20 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл.

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

Порядок работы:

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **5 мкл RT-G-mix-1**, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
3. К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMiv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. Внести в пробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечники с фильтром, добавить по **10 мкл РНК-пробы** в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37 °С на 30 мин.
7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к **20 мкл кДНК** отдельным наконечником с фильтром добавить **20 мкл ДНК-буфера**, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реагентов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ⁸	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
6	60	30	3,0
8	80	40	4,0
10	100	50	5,0
12	120	60	6,0
14	140	70	7,0
16	160	80	8,0
18	180	90	9,0
20	200	100	10,0
22	220	110	11,0
24	240	120	12,0
26	260	130	13,0
28	280	140	14,0
30	300	150	15,0
32	320	160	16,0

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для «ПЦР-комплектов» варианты FRT-100 F, FRT-200 F

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реагентов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ⁸	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
110	1100	550	55
220	2200	1100	110

⁸ Число исследуемых образцов (N) + 2 контроля этапа экстракции РНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на 1 образец (N+2+2+1).

Форма 1: **REF** Н-2241-1-2; Форма 2: **REF** Н-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** Н-2247-1 **VER** 21.11.22 / стр. 52 из 52