

«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

«20» *сентября* 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления и количественного определения РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР

АмплиСенс® COVID-19-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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	12
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	20
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	25
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	27
СОСТАВ.....	29
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	32
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	33
А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР	33
Б. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	34
В. Анализ и интерпретация результатов.....	35
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	41
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	43
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	44
БИБЛИОГРАФИЯ	45
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	46
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	47
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	50
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	53

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДИ 95 %	- 95 % доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	- желудочно-кишечный тракт
К+	- положительный контроль ОТ-ПЦР
К-	- отрицательный контроль ОТ-ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
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
COVID-19	- Coronavirus disease 2019
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
SARS-CoV-2	- Severe acute respiratory syndrome <i>coronavirus-2</i>

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL предназначен для выявления и количественного определения РНК SARS-CoV-2 в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, плазма крови, фекальный / ректальный мазок, аутопсийный материал) и в объектах окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды) методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала.

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, для исследования аутопсийного материала легких с целью установления этиологии пневмонии, а также для исследования объектов окружающей среды с целью профилактики коронавирусной инфекции человека.

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

Результат ОТ-ПЦР должен интерпретироваться в соответствии с клинико-эпидемиологическими данными. Отрицательный результат ОТ-ПЦР 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 совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL), одновременной обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого микроорганизма и кДНК ВКО-FL с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL 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. Амплификация участка кДНК проводится 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».

Количественное определение РНК основывается на существовании линейной зависимости между логарифмом исходной концентрации РНК-мишени в исследуемом образце и экспоненциальным увеличением флуоресцентного сигнала. ПЦР-исследование анализируемых образцов проводят одновременно с образцом с известной концентрацией РНК-мишени – ПКО, который аттестован по методике Изготовителя. По результатам амплификации ПКО проводится расчет концентрации РНК-мишени в исследуемых образцах.

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

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО-FL	кДНК SARS-CoV-2
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	ген RdRp (RNA-dependent RNA polymerase)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Форма 2: «МАГНО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Форма 3: «МАГНО-сорб» вариант 100M, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100M F

Форма 4: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Формы 1, 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма 4 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК.

Формы 1, 2 и 3 рассчитаны на проведение 100 тестов, включая контроли. Форма 4 рассчитана на проведение 110 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон измерения и предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, ГЭ (копий) / мл	Диапазон измерения, ГЭ (копий) / мл
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	«РИБО-преп» вариант 100, «МАГНО-сорб» вариант 100 и вариант 100M	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и вариант FRT-100M F	5x10 ²	5x10 ² – 3x10 ⁸
Мокрота / аспират из зева			1x10 ³	5x10 ³ – 3x10 ⁸
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов			5x10 ²	5x10 ² – 3x10 ⁸
Плазма крови			1x10 ³	1x10 ⁴ – 3x10 ⁸
Фекальный / ректальный мазок			1x10 ³	1x10 ⁴ – 3x10 ⁸
Аутопсийный материал			1x10 ³	5x10 ³ – 3x10 ⁸

Примечание – одна копия мишени кДНК соответствует одному геномному эквиваленту (геному) микроорганизма.

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 участок РНК коронавируса SARS-CoV-2 (клинические образцы, содержащие РНК SARS-CoV-2 в концентрации от 5×10^2 до 5×10^6 ГЭ (копий) / мл, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей). Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов/штаммов:

- 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[™]), *Chlamydomonas 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[™]), *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-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;

- образцы панели «CORONAVIRUS RNA SPECIFICITY PANEL» (Erasmus Medical Center – EMC, Роттердам, Нидерланды): Severe acute respiratory syndrome *coronavirus* Strain HKU39849, Middle East respiratory syndrome *coronavirus*, *Human coronavirus*, Strain NL63 в концентрации не более 1×10^9 ГЭ/мл и не менее 1×10^7 ГЭ/мл;
- штаммы из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева»: A/Санкт-Петербург/НИИГ-252/19 (*Influenza virus A* (H3N2)), A/Калининград/75/19 (*Influenza virus A* (H1N1)pdm09), B/Washington/02/19 (*Influenza virus B* линия Виктория), B/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;
- ДНК человека в концентрации 0,2 мг/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 определения РНК SARS-CoV-2

Повторяемость и воспроизводимость определения РНК SARS-CoV-2 были установлены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартный образец предприятия, содержащий РНК SARS-CoV-2 в концентрации 5×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца 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 разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3, 4.

Таблица 3

Повторяемость

АмплиСенс® COVID-19-FL	Тип образцов	Количество повторов	Совпадение результатов, %	Ожидаемое значение концентрации, Ig	Среднее значение измерения концентрации, Ig	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма 1	Положительные	10	100	3,70	3,88	0,18	4,75
	Отрицательные	10	100	-	-	-	-
Форма 2	Положительные	10	100	3,70	3,61	0,13	3,58
	Отрицательные	10	100	-	-	-	-

Таблица 4

Воспроизводимость

АмплиСенс® COVID-19-FL	Тип образцов	Количество повторов	Совпадение результатов, %	Ожидаемое значение концентрации, Ig	Среднее значение измерения концентрации, Ig	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма 1	Положительные	40	100	3,70	3,89	0,17	4,46
	Отрицательные	40	100	-	-	-	-
Форма 2	Положительные	40	100	3,70	3,68	0,13	3,49
	Отрицательные	40	100	-	-	-	-

Правильность количественного определения РНК SARS-CoV-2

Правильность количественного определения РНК SARS-CoV-2 была установлена путем тестирования биологического материала, в котором предварительно не была выявлена РНК SARS-CoV-2, а затем был добавлен стандартный образец предприятия, содержащий РНК SARS-CoV-2 в концентрациях 5×10^2 , 7×10^2 , 5×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^7 , 3×10^8 ГЭ/мл.

Таблица 5

Вид исследуемого материала	Количество повторов	Ожидаемое значение концентрации, Ig	Среднее значение измерения концентрации, Ig	Систематическая погрешность (В), %
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	12	8,48	8,97	5,79
	12	7,00	7,23	3,28
	12	5,00	5,26	5,18
	12	4,00	4,03	0,75
	10	2,70	2,91	7,69
Мокрота / аспират из зева	12	8,48	8,94	5,50
	12	7,00	7,12	1,77
	12	5,00	5,23	4,55
	12	3,70	3,91	5,69
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	9	8,48	8,88	4,70
	9	7,00	6,97	0,44
	9	5,00	4,99	0,22
	11	3,70	3,78	2,10
	11	2,70	2,93	8,51

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 9 из 53

Вид исследуемого материала	Количество повторов	Ожидаемое значение концентрации, Ig	Среднее значение измерения концентрации, Ig	Систематическая погрешность (В), %
Плазма крови	12	8,48	9,07	6,97
	12	7,00	7,11	1,60
	12	5,00	5,18	3,62
	12	4,00	3,99	0,14
Фекальный / ректальный мазок	12	8,48	9,13	7,70
	12	7,00	7,23	3,20
	12	5,00	5,30	6,01
	12	4,00	4,06	1,56
Аутопсийный материал	9	8,48	8,96	5,72
	9	7,00	7,10	1,40
	8	5,00	5,12	2,34
	9	3,70	3,89	5,23

Систематическая погрешность (В) измерения логарифма концентрации РНК SARS-CoV-2 не превышает 20 %.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 6

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® COVID-19-FL		Результаты применения референтного метода ¹	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Всего исследовано 160 образцов	положительных	80	0
		отрицательных	0	80
Мокрота / аспират из зева	Всего исследовано 70 образцов	положительных	35	0
		отрицательных	0	35
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	Всего исследовано 70 образцов	положительных	35	0
		отрицательных	0	35
Плазма крови	Всего исследовано 70 образцов	положительных	35	0
		отрицательных	0	35
Фекальный / ректальный мазок	Всего исследовано 70 образцов	положительных	35	0
		отрицательных	0	35
Аутопсийный материал	Всего исследовано 70 образцов	положительных	35	0
		отрицательных	0	35
Концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	Всего исследовано 120 образцов	положительных	20	0
		отрицательных	0	100

¹ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ПУ № РЗН 2014/1987) в сочетании с Системой капельной цифровой ПЦР QX100 droplet digital PCR (ПУ № ФСЗ 2012/13278).

Диагностические характеристики набора реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ³ , (с доверительной вероятностью 95 %)
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100 (95-100) %	100 (95-100) %
Мокрота / аспират из зева	100 (90-100) %	100 (90-100) %
Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов	100 (90-100) %	100 (90-100) %
Плазма крови	100 (90-100) %	100 (90-100) %
Фекальный / ректальный мазок	100 (90-100) %	100 (90-100) %
Аутопсийный материал	100 (90-100) %	100 (90-100) %
Концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	100 (83-100) %	100 (96-100) %

Были использованы:

- 227 образцов биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, плазма крови, фекальный / ректальный мазок, аутопсийный материал) от пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом COVID-19;
- 28 образцов биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота / аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, плазма крови, фекальный / ректальный мазок, аутопсийный материал), содержащих вирус SARS-CoV-2 в разных концентрациях;
- 14 образцов объектов окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды), в которых с помощью референтного метода обнаружено и определено количество РНК SARS-CoV-2;
- 6 образцов объектов окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды), содержащих вирус SARS-CoV-2 в разных концентрациях;
- 80 образцов мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

от пациентов с иной этиологией заболевания (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-NKUI*);

- 35 образцов мокроты / аспиратов из трахеи от пациентов с иной этиологией заболевания (грипп А и В, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*);
- 35 образцов бронхоальвеолярного лаважа / промывных вод бронхов от пациентов с иной этиологией заболевания (грипп А и В, легионеллезная инфекция);
- 35 образцов плазмы крови от больных аденовирусной инфекцией;
- 35 образцов фекалий от больных ротавирусной инфекцией;
- 35 образцов аутопсийного материала от пациентов с иной этиологией заболевания (грипп А);
- 100 образцов объектов окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды).

Образцы биологического материала получены из ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в рамках деятельности лаборатории молекулярных методов ОМДиЭ, референс-центра по мониторингу за возбудителями инфекций верхних и нижних дыхательных путей Роспотребнадзора и лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций. Образцы объектов окружающей среды получены из референс-центра по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций Роспотребнадзора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности

(опасности)»⁴, СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний 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

⁴ В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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 форма 4 набора реагентов безопасна.

При использовании по назначению форм 1, 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.

Информация о номерах серий компонентов, входящих в состав серии набора реагентов, доступна по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы,

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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) или другие, в соответствии с МР 3.1.0117-17 «Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции».
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. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
4. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия).
5. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия).
6. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания).
7. Вакуумная система забора крови Vacuette с КЗ ЭДТА (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).
8. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ

Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша, или аналогичная).

9. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

10. Реагент «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты.
11. 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).
12. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
16. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
17. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого (аутопсийного) материала.
18. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичные).
19. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
20. Автоматические дозаторы переменного объема (например,

- ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
21. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 22. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 23. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

При работе с формой 1, включающей комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100:

24. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
25. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
27. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
28. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
29. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
30. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичные).
31. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
32. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
33. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
34. Автоматические дозаторы переменного объема (например,

ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

35. Холодильник от 2 до 8 °С.

36. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

37. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При работе с формами 2 и 3, включающими комплекты реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100 и вариант 100M:

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

39. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

40. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

41. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

42. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

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

44. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

45. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).

46. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл (например, Promega («Промега»), США, или аналогичный).

47. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).

48. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

49. Холодильник от 2 до 8 °С.

50. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

51. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и

инактивации материалов.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

52. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария), KingFisher Flex (Thermo FS (Thermo Fisher Scientific) («Термо Фишер Сайентифик»), Финляндия) и другие, рекомендованные Изготовителем).

53. Набор расходных материалов к автоматической станции (например, Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG («Гамильтон Бонадуц АГ»), Швейцария), KingFisher Flex (Thermo FS (Thermo Fisher Scientific) («Термо Фишер Сайентифик»), Финляндия)).

При работе с формой 4:

54. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147) или «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265).

55. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

56. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) 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 (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 19 из 53

- крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
57. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 58. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 59. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 60. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 61. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 62. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США).
 63. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 64. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 65. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Биологический материал

Рекомендуется исследовать не менее двух типов биологического материала (материал из респираторного тракта, плазма крови и, при наличии симптомов поражения ЖКТ, фекальный или ректальный мазки).

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки (при наличии симптомов поражения верхних дыхательных путей),
- мокрота / аспират из зева (при наличии симптомов

- поражения нижних дыхательных путей),
- бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов (при наличии симптомов поражения нижних дыхательных путей),
- плазма крови,
- фекальный / ректальный мазок (при наличии симптомов поражения ЖКТ),
- аутопсийный материал.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как один образец. Для этого берут мазки разными зондами сначала со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мазки со слизистой оболочки нижнего носового хода

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Мазки у детей и взрослых берут сухим стерильным назофарингеальным вельюрампомом на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая 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 забора материала конец зонда с тампоном опускают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 1 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков, при этом гибкая часть зонда складывается в 3 раза, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку герметично закрывают и маркируют.

Для взятия мазков у взрослых допустимо использовать сухие стерильные зонды из полистирола с вязкими тампонами. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 21 из 53

носоглотки и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (5–6 см). После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Образцы берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл транспортной среды и зондом с мазком из носоглотки. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Допускается хранение мазков со слизистой оболочки 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

Образцы собирают согласно МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» и помещают в одноразовые герметичные емкости из полипропилена. Если нет возможности получить мокроту или аспират из зева, собирают слюну, образующуюся утром после глубокого откашливания сразу после пробуждения.

Допускается хранение мокроты / аспирата из зева 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

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 22 из 53

года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов

Образцы объемом не менее 5 мл собирают согласно МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» и помещают в одноразовый плотно закрывающийся пластиковый контейнер.

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 в качестве антикоагулянта. 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 0,5 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 – 2 мл. Для экстракции РНК используют 50 мкл плазмы крови.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 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.

Фекальный / ректальный мазок

Фекальный мазок собирается из подгузника или с поверхности одноразового пакета, положенного в горшок или судно. Зонд из полипропилена с вязким тампоном погружают до конца вязкого тампона в пробу фекалий, выдерживают до пропитывания, после чего вязкий тампон отламывают в пробирку с 0,5 мл транспортной среды (физиологического раствора или фосфатного буфера), придерживая его крышкой пробирки, и герметично закрывают пробирку.

Ректальный мазок

Для взятия ректального мазка зонд из полипропилена с вязким тампоном вводят в прямую кишку на глубину 2 см, производят вращательное движение и извлекают. Вязкий тампон 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 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. Для проведения ПЦР-исследования проводят предобработку образцов.

Допускается хранение аутопсийного материала до проведения предобработки:

- 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.

Объекты окружающей среды

Материалом для исследования служат:

- концентраты образцов воды,
- смывы с объектов окружающей среды.

Концентраты образцов воды (для проведения ПЦР-исследования)

Взятие образцов воды производится 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.

Для экстракции РНК используют 100 мкл образца.

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 образцов объектов окружающей среды при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

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, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов,

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 25 из 53

мокрота / аспират из зева, фекальный / ректальный мазок, 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.

Бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов

Содержимое емкости перемешивают пипетированием наконечником с фильтром и отбирают 100 мкл для экстракции РНК.

Мокрота / аспират из зева

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с мокротой добавляется пятикратное количество реагента «МУКОЛИЗИН» относительно количества мокроты и инкубируется при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) при периодическом помешивании в течение 10-20 мин (до визуального просветления). 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 обработанной мокроты замораживают.

Фекальный / ректальный мазок

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.

Аутопсийный материал

Образец гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков (или гомогенизаторов), 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). 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа гомогенат замораживают.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – 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.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

Для контроля эффективности экстракции РНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально interfering вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны

эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, фекальный / ректальный мазок, мокрота / аспират из зева, плазма крови, аутопсийный материал), используемом для исследования.

Были протестированы модельные образцы биологического материала без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 8. Модельные образцы содержали стандартный образец предприятия с концентрацией РНК SARS-CoV-2 5×10^3 ГЭ/мл.

Результаты, полученные с помощью комплектов для экстракции «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб», представлены в табл. 8.

Таблица 8

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
		Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено	Не обнаружено
Мокрота	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
Фекальный / 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	Объём, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ⁶	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

Комплект реагентов входит в состав формы 1.

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

Реагент	Описание	Вариант 100		Вариант 100М	
		Объём, мл	Количество	Объём, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого или розового цвета ⁷	35	3 флакона	107	1 флакон
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка	1,0	1 пробирка
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	43	2 флакона	87	1 флакон
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	15	2 флакона	35	1 флакон
Магнетизирующая силика	Суспензия магнитных частиц	1,0	2 пробирки	1,0	2 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,25	8 пробирок	14	1 флакон

«МАГНО-сорб» вариант 100 входит в состав формы 2.

«МАГНО-сорб» вариант 100М входит в состав формы 3.

⁶ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

⁷ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F или вариант FRT-100M F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК SARS-CoV-2 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Вариант FRT-100 F		Вариант FRT-100M F	
		Объем, мл	Количество	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка	0,06	1 пробирка
Ревертаза-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка	0,03	1 пробирка
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка	0,03	1 пробирка
K+ SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки	5,0	1 пробирка
ПКО SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F входит в состав форм 1, 2 и 4.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100M F входит в состав формы 3.

Реагенты комплектов упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). 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.

Электронный калькулятор на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® COVID-19» – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 30 из 53

СОСТАВ

набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК с гибридационно-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.

Для экстракции РНК используют комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» вариант 100, в соответствии с Приложением 1;
- «МАГНО-сорб» вариант 100 и вариант 100М, в соответствии с Приложением 2.

ВНИМАНИЕ! В случае использования формы 4 экстракцию необходимо проводить в соответствии с Приложением 1 или Приложением 2. При использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265) раствор для отмывки 5 не используется.

Каждая индивидуальная постановка должна сопровождаться постановкой двух контролей: отрицательного контроля экстракции (ОК) и положительного контроля экстракции (ПК). В качестве ОК используют 100 мкл ОКО, в качестве ПК – 10 мкл ПКО SARS-CoV-2, добавленные к 90 мкл ОКО.

Экстракция РНК/ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL.

ВНИМАНИЕ! ОТ-ПЦР 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.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И 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-ПЦР зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка проб для ОТ-ПЦР

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL SARS-CoV-2, 5 мкл ПЦР-буфера-С, 0,5 мкл полимеразы (TaqF), 0,25 мкл ревертазы-Н и 0,25 мкл RT-G-mix-2.** Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL SARS-CoV-2.** Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL SARS-CoV-2, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ревертазы-Н и RT-G-mix-2,** осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК,**

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

Форма 4: **REF** Н-4094-1-1 / **VER** 20.02.21 / стр. 33 из 53

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 **ПКО**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При получении новой серии набора реагентов необходима постановка положительного и отрицательного контролей ОТ-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+ SARS-CoV-2**.

При подозрении на возможную контаминацию в лаборатории необходима постановка К–. Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

Б. Проведение ОТ-ПЦР 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. 9).

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ⁸			Приборы планшетного типа ⁹		
	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	50	20 мин	1	50	20 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	5	95	10 с	5
	60	20 с		60	20 с	
4	95	10 с	40	95	10 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	20 с детекция флуоресц. сигнала	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE**. При одновременном проведении нескольких тестов с такой же программой амплификации назначается детекция и по другим используемым каналам.

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.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

времени», с помощью приведенного ниже алгоритма или электронного калькулятора на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® COVID-19».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК SARS-CoV-2

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы РНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

При количественном исследовании проводят расчет концентрации РНК-мишени в исследуемом образце исходя из значений C_t , полученных для исследуемого образца и ПКО.

Принцип интерпретации результатов при проведении качественного исследования указан в табл. 11:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

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

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

** 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 сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Принцип интерпретации результатов при проведении количественного исследования:

Образцы, для которых получен результат «**РНК SARS-CoV-2 обнаружена**» в качественном исследовании, могут быть интерпретированы в количественном формате.

Расчет проводится по формуле:

$$C_{\text{обр}} = C_{\text{ПКО}} \times 2^{(C_{t\text{ПКО}} - C_{t\text{обр}})},$$

где

$C_{\text{обр}}$ – концентрация РНК SARS-CoV-2 в исследуемом образце в ГЭ (копий) / мл;

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация ПКО, указанная во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов;

$C_{t\text{ПКО}}$ – значение порогового цикла (C_t) ПКО (положительного контроля экстракции) по каналу для флуорофора JOE;

$C_{t\text{обр}}$ – значение порогового цикла (C_t) образца по каналу для флуорофора JOE.

Результат количественного исследования (концентрация РНК SARS-CoV-2 в исследуемом образце) можно дополнительно интерпретировать в соответствии с условной шкалой:

Таблица 12

Условная шкала интерпретации результатов количественного исследования

Значение концентрации, ГЭ (копий) / мл	Интерпретация результата исследования в соответствии с условной шкалой
$C_{\text{обр}} \geq 10^8$	Очень высокая нагрузка РНК SARS-CoV-2
$10^6 \leq C_{\text{обр}} < 10^8$	Высокая нагрузка РНК SARS-CoV-2
$5 \times 10^4 \leq C_{\text{обр}} < 10^6$	Средняя нагрузка РНК SARS-CoV-2
$10^3 \leq C_{\text{обр}} < 5 \times 10^4$	Низкая нагрузка РНК SARS-CoV-2
$C_{\text{обр}} < 10^3$	Очень низкая нагрузка РНК SARS-CoV-2*

* Применимо только для следующего исследуемого

материала: мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды.

Примечание – согласно литературным данным концентрация РНК SARS-CoV-2 в биологическом материале от инфицированных (мазки из носо- и ротоглотки, мокрота, фекалии) варьирует от ~500 ГЭ (копий)/мл (предел обнаружения) до 1×10^{10} ГЭ (копий)/мл [1, 2]. Среднее значение концентрации РНК SARS-CoV-2 в мокроте у больных пневмонией составляет $1,1 \times 10^5$ ГЭ (копий)/мл (ДИ 95% ($3,6 \times 10^4$ – $3,3 \times 10^5$ ГЭ (копий)/мл)), в мазках из носо- и ротоглотки – $4,3 \times 10^4$ ГЭ (копий)/мл (ДИ 95% ($2,0 \times 10^4$ – $9,4 \times 10^4$ ГЭ (копий)/мл)) [1]. У детей, инфицированных SARS-CoV-2, медианная концентрация РНК SARS-CoV-2 в мазках из носо- и ротоглотки составляет $3,6 \times 10^7$ ГЭ (копий)/мл, в фекалиях – $4,8 \times 10^7$ ГЭ (копий)/мл [2].

Контроль качества исследования

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР в соответствии с табл. 13 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Количественное исследование проводится только в том случае, когда значения порогового цикла (Ct) положительного контроля экстракции (ПК) и исследуемых образцов определены меньше граничных.

Таблица 13

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируе-мый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Контроль качества количественного исследования может быть проведен путем тестирования дополнительного повтора положительного контроля экстракции (**ПКО SARS-CoV-2**), который обозначают как контроль качества количественного исследования (ККИ). Концентрация, полученная для образца ККИ, должна укладываться в диапазон, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Контроль качества количественного исследования может быть также проведен с использованием панели контрольных образцов «SARS-CoV-2», содержащих РНК SARS-CoV-2 и охарактеризованных количественно, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (предоставляется по запросу).

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 13) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции РНК, для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов,

исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК.

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 и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес¹⁰. 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. «РИБО-преп» вариант 100 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ревертазу-Н, RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «МАГНО-сорб» вариант 100 хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ревертазу-Н, RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 хранить в защищенном от света месте.

Форма 3. «МАГНО-сорб» вариант 100М хранить при температуре от 2 до 25 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100М F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ревертазу-Н, RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 хранить в защищенном от света месте.

Форма 4. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF),

¹⁰ Стабильность в течение 12 мес не подтверждена исследованиями в реальном времени. Подтверждена стабильность при использовании набора реагентов в течение 5 мес.

ревертазу-Н, RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 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.ru¹¹.

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.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

¹¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

- ГОСТ ISO 14971-2011 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям».
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации».
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro».
- ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации» (пп. 5.2.1, 6.1.3, 6.2, 6.3.2-6.3.5, 6.3.12, 9, 13.2).
- ГОСТ 15.309-98 «Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения» (п. 6).
- ГОСТ ISO 17511-2011 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам».
- ГОСТ 14192-96 «Маркировка грузов» (п. 4.1).
- СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Prospective study comparing deep-throat saliva with other respiratory tract specimens in the diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) / C.K.C. Lai, Z. Chen, G. Lui et al. // J Infect Dis. – 2020. – 222(10). – P. 1612-1619. doi: 10.1093/infdis/jiaa487.
2. Viral RNA Load in Mildly Symptomatic and Asymptomatic Children with COVID-19, Seoul, South Korea / M. S. Han, M.-W. Seong, N. Kim et al. // Emerg Infect Dis. – 2020. - 26(10). – P. 2497-2499. doi: 10.3201/eid2610.202449.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



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 объектов окружающей среды и биологического материала за исключением фекальных/ректальных мазков и плазмы крови. При работе с фекальными/ректальными мазками и плазмой крови для экстракции РНК используется 50 мкл образца биоматериала и 50 мкл ОКО.

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.

Процедура экстракции РНК

1. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции), промаркировать.
2. В каждую пробирку внести **10 мкл ВКО-FL**.
3. В каждую пробирку с исследуемыми образцами и контролями экстракции внести по **300 мкл раствора для лизиса**.
4. В пробирки с **ВКО-FL** внести по **100 мкл** исследуемых образцов (за исключением фекальных/ректальных мазков и плазмы крови), используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. При работе с фекальными/ректальными мазками и плазмой крови в пробирки с ВКО-FL внести по 50 мкл образца биоматериала и 50 мкл ОКО.
5. В пробирку положительного контроля (ПК) с **ВКО-FL** внести **10 мкл ПКО SARS-CoV-2** и **90 мкл ОКО**.
6. В пробирку отрицательного контроля (ОК) с **ВКО-FL** внести **100 мкл ОКО**.
7. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли

- жидкости на вортексе.
8. Содержимое пробирок прогреть **5 мин** при **65 °С** в термостате, перемешать и осадить капли жидкости на вортексе.
 9. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
 10. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **12 тыс g** (например, 13,4 тыс об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).
 11. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 12. 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.
 13. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге **в течение 1-2 мин** при **12 тыс g**.
 14. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 15. Аналогично провести одну отмывку, используя **200 мкл раствора для отмывки 4**.
 16. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин** для подсушивания осадка.
 17. Добавить в пробирки **100 мкл РНК-буфера**.
 18. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
 19. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР, 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 100 и вариант 100М

Экстракция РНК проводится из 100 мкл подготовленных образцов объектов окружающей среды и биологического материала за исключением фекальных/ректальных мазков и плазмы крови. При работе с фекальными/ректальными мазками и плазмой крови для экстракции РНК используется 50 мкл образца биоматериала и 50 мкл ОКО.

Подготовка к процедуре экстракции РНК

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.

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 ВКО-FL, компонент А и магнетизированную силику из расчета на одну точку: **10 мкл ВКО-FL, 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	ВКО-FL, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

3. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО-FL, 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** (за исключением фекальных/ректальных мазков и плазмы крови), используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. При работе с фекальными/ректальными мазками и плазмой крови в пробирки внести по **50 мкл образца** биоматериала и

- 50 мкл ОКО, перемешать на вортексе.
6. Поставить **положительный контроль экстракции (ПК)**. Для этого пробирку с лизирующим раствором добавить **10 мкл ПКО SARS-CoV-2** и **90 мкл ОКО**, перемешать на вортексе.
 7. Поставить **отрицательный контроль экстракции (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, 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 отобрать 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. Отобрать 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. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем осторожно отобрать 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-ПЦР осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива. РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР, 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»

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100 и вариант 100М может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»¹² (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 станции, должен быть увеличен (с учетом запаса) до 110 мкл.

Например – объем для исследуемых образцов 110 мкл (при работе с фекальными/ректальными мазками по 55 мкл образца биоматериала и 55 мкл ОКО), для образца ОК – 110 мкл ОКО, для образца ПК – 99 мкл ОКО и 11 мкл ПКО.

Объем ВКО-FL на один образец – 10 мкл.

Рекомендуемый объем элюции – 100 мкл.

¹² Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

Форма 1: **REF** НК1-4091-1-1; Форма 2: **REF** НК3-4092-1-1; Форма 3: **REF** НК3-4093-1-1;

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное количество реакций				
		10,00	5,00	0,25	0,50	0,25
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ¹³	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-С	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	Ревертаза-Н
1	4	40	20	1,00	2,00	1,00
2	5	50	25	1,25	2,50	1,25
3	6	60	30	1,50	3,00	1,50
4	7	70	35	1,75	3,50	1,75
5	8	80	40	2,00	4,00	2,00
6	9	90	45	2,25	4,50	2,25
7	10	100	50	2,50	5,00	2,50
8	11	110	55	2,75	5,50	2,75
9	12	120	60	3,00	6,00	3,00
10	13	130	65	3,25	6,50	3,25
11	14	140	70	3,50	7,00	3,50
12	15	150	75	3,75	7,50	3,75
13	16	160	80	4,00	8,00	4,00
14	17	170	85	4,25	8,50	4,25
15	18	180	90	4,50	9,00	4,50
16	19	190	95	4,75	9,50	4,75
17	20	200	100	5,00	10,00	5,00
18	21	210	105	5,25	10,50	5,25
19	22	220	110	5,50	11,00	5,50
20	23	230	115	5,75	11,50	5,75
21	24	240	120	6,00	12,00	6,00
22	25	250	125	6,25	12,50	6,25
23	26	260	130	6,50	13,00	6,50
24	27	270	135	6,75	13,50	6,75
25	28	280	140	7,00	14,00	7,00
26	29	290	145	7,25	14,50	7,25
27	30	300	150	7,50	15,00	7,50
28	31	310	155	7,75	15,50	7,75
29	32	320	160	8,00	16,00	8,00
30	33	330	165	8,25	16,50	8,25
31	34	340	170	8,50	17,00	8,50
32	35	350	175	8,75	17,50	8,75

¹³ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК и ПК), + запас на один образец. Если используются контроли ОТ-ПЦР (К+ и К-), то количество реакций увеличится на 2.