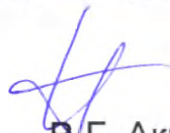


«УТВЕРЖДАЮ»

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

«22» января 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	14
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	16
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	16
СОСТАВ	18
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	20
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	20
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	21
А. Подготовка проб для ОТ-ИТ.....	21
Б. Проведение ОТ-ИТ с детекцией в режиме «реального времени»	22
В. Анализ и интерпретация результатов	23
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	26
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	27
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	28
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	29
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К-	- отрицательный контроль ОТ-ИТ
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПК	- положительный контроль экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ИТ	- изотермическая амплификация
ОТ-ИТ	- изотермическая амплификация с обратной транскрипцией
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
С+	- положительный контрольный образец
С-	- отрицательный контрольный образец
COVID-19	- Coronavirus disease 2019
ИТ	- isothermal amplification
SARS-CoV-2	- Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® SARS-CoV-2-ИТ предназначен для качественного определения РНК SARS-CoV-2 в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носа и ротоглотки) методом обратной транскрипции и изотермической амплификации (ОТ-ИТ) с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для ОТ-ИТ служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого биоматериала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от прибывших из регионов, где регистрируются случаи заболевания COVID-19, лиц, контактировавших с больными COVID-19, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, больных острой респираторной инфекцией при подозрении на COVID-19.

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

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

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

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента обратной транскриптазы. Изотермическая амплификация участка кДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Bst-полимеразы.

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

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

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM
кДНК-мишень	кДНК SARS-CoV-2
Область амплификации	ген <i>ORF1ab</i>

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ*

***Форма 1:** «IT-комплект» вариант 200

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

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

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

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

Форма 1 рассчитана на проведение 200 реакций ОТ-ИТ, включая контроли. Формы 2, 3 рассчитаны на проведение 200 тестов, включая контроли. Объем контролей во всех формах выпуска рассчитан на 10 независимых постановок.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, ГЭ (копий) / мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«РИБО-преп» вариант 100	«IT-комплект» вариант 200	1×10^3
	«МАГНО-сорб» вариант 100М		2×10^3

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

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и

*Примечание – Формы 1 и 3 не заявлены на государственную регистрацию по Постановлению Правительства РФ от 3 апреля 2020 г. N 430 «Об особенностях обращения медицинских изделий, в том числе государственной регистрации серии (партии) медицинского изделия».

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 не менее 1×10^3 ГЭ (копий) / мл, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов проверялась *in silico* посредством сравнения последовательностей праймеров с базой данных нуклеотидных последовательностей Nucleotide BLAST для следующих микроорганизмов: *Chlamydomonas pneumoniae*, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*, *Staphylococcus epidermidis*, *Human Respiratory Syncytial Virus*, *Human Parainfluenza Virus 1*, *Human Parainfluenza Virus 2*, *Human Parainfluenza Virus 3*, *Human Rhinovirus 17*, *Human Adenovirus 1*, *Human Coronavirus*, Strain OC43 (ATCC[®] VR-1558[™]), *Human Coronavirus*, Strain 229E (ATCC[®] VR-740[™]), *Human Coxsackievirus B1*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella pertussis*. Значимых совпадений обнаружено не было.

Также аналитическая специфичность набора реагентов подтверждена при тестировании ДНК человека в концентрации 10 мкг/мл, ДНК *E.coli* в концентрации 10 мкг/мл – неспецифических реакций выявлено не было.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс[®] Cov-Bat-FL» (ПУ № РЗН 2014/1987).

Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс[®] SARS-CoV-2-IT, Форма 2, Серия: 20.01.21**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100.00% (96.38% - 100.00%)	100.00% (96.38% - 100.00%)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические 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)»³, 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 молекулярного исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

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

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

³ 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности форма 1 набора реагентов безопасна.

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

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и

хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

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. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия).
3. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия).
4. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания).
5. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

6. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ПУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты.
7. 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; pH=7,5±0,2).
8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. 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).
12. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. 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).
14. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
15. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
16. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
17. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
18. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

При работе с формой 1:

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

(ПУ № ФСР 2010/07265).

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

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

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

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

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

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

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

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

27.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).

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

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

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

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

32.Холодильник от 2 до 8 °С.

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

34.Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и

инактивации материалов.

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

35. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
36. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
37. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
38. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
39. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
40. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
41. Вortex (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
42. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
43. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл (например, Promega («Промега»), США, или аналогичный).
44. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
45. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
46. Холодильник от 2 до 8 °С.
47. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
48. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

49. Автоматическая станция для экстракции НК (например,

Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария) или KingFisher Flex (Thermo FS (Termo Fisher Scientific), Финляндия) и другие, рекомендованные Изготовителем).

50. Набор расходных материалов к автоматической станции (например, Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария), KingFisher Flex (Thermo FS (Termo Fisher Scientific), Финляндия)).

Обратная транскрипция и изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

51. 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) планшет на 96 лунок (например, Axugen, Inc («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или 384 лунки (например, SSlibio, США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа на 96 или 384 лунки соответственно.
- г) 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 крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

52. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

53. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

54. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс)

- (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
55. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
56. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
57. 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»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), QuantStudio 5 (Thermo, США).
58. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
59. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
60. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки 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 велью-тампоном 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 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.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

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.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения 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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут

присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), 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. 4.

Модельные образцы содержали стандартный образец предприятия с концентрацией РНК SARS-CoV-2 5×10^3 ГЭ/мл.

Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

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

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

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

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

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

«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 ⁵	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная жидкость от бесцветного до жёлтого или розового цвета ⁶	107	1 флакон
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	87	1 флакон

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

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

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	35	1 флакон
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	14	1 флакон
Магнетизированная силика	Суспензия магнитных частиц	1,0	2 пробирки
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

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

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Для экстракции РНК используют комплекты реагентов:

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

ВНИМАНИЕ! В случае использования формы 1 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 С–, в качестве ПК – 10 мкл С+ IT-SARS-CoV-2, добавленные к 90 мкл С–.

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

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

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

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

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

А. Подготовка проб для ОТ-ИТ

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

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

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

2. Разморозить и перемешать содержимое пробирки с **IT-mix SARS-CoV-2**, осадить капли на вортексе. Содержимое пробирки **IT-mix-E** не перемешивать, осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае если реагенты «IT-комплекта» будут израсходованы в течение 1 недели, допускается их хранение при температуре от 2 до 8 °С. По истечении указанного срока реагенты выбросить.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **IT-mix SARS-CoV-2** и **IT-mix-E**. Тщательно перемешать, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ИТ исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **10 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

7. Поставить контрольные реакции:

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

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

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

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

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

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в прибор 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.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации (см. табл. 6):

Таблица 6

Канал для флуорофора	FAM
Продукт амплификации	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 (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов указан в табл. 7:

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

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

Контроль качества исследования

Результат исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ИТ в соответствии с табл. 8 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов исследования

Контроль	Контролируемый этап исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM
ПК	Экстракция РНК	<u>Определено меньше граничного</u>
ОК	Экстракция РНК	отсутствует
К–	Обратная транскрипция и изотермическая амплификация	отсутствует

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

Возможные ошибки:

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

линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес⁷. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

Хранение.

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

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

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

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

⁷ Данные не подтверждены исследованиями в реальном времени.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

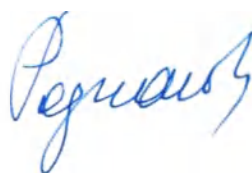
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

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.ru⁸.

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.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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 биологического материала.

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

Подготовка к процедуре экстракции РНК

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

Процедура экстракции РНК

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

центрифуги MiniSpin, Eppendorf).

10. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
11. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
12. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге **в течение 1-2 мин при 12 тыс g** на микроцентрифуге.
13. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
14. Аналогично провести одну отмывку, используя **200 мкл раствора для отмывки 4**.
15. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка.
16. Добавить в пробирки **90 мкл РНК-буфера**.
17. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
18. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин при 12 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК.

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

Экстракция РНК проводится из 100 мкл подготовленных образцов биологического материала.

Подготовка к процедуре экстракции РНК

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

Процедура экстракции РНК

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

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

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

- этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл С–**, перемешать на вортексе.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин.** Кратким центрифугированием осадить капли.
 9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин.**
 10. По внутренней стенке пробирки осторожно 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. Ресуспандировать 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. Ресуспандировать 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-ИТ осуществляется, не снимая пробирок с магнитного штатива. РНК-пробы готовы к постановке ОТ-ИТ, которую

рекомендуется проводить сразу же после получения очищенной РНК.

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

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

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100М может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁹ (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария), KingFisher Flex (Thermo FS) (Termo 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, для образца ОК – 110 мкл С–, для образца ПК – 99 мкл С– и 11 мкл С+ IT-SARS-CoV-2.

Рекомендуемый объем элюции – 100 мкл.

⁹ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 33
(тридцать три) лист а

Руководитель подразделения развития и качества продукции
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 60/20 от 17.04.2020 г.)

Е.А. Козлова

«21» апреля 2021 г.



Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 33 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.

