

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной
работе – ВРИО директора
Федерального бюджетного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



А.В. Горелов

« 03 » _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления мутации N501Y
SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и
изотермической амплификации (ОТ-ИТ)

АмплиСенс® SARS-CoV-2-N501Y-IT

по ТУ 21.20.23-416-01897593-2021

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.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	11
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	14
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка проб для ОТ-ИТ.....	14
Б. Проведение ОТ-ИТ с детекцией в режиме «реального времени»	15
В. Анализ и интерпретация результатов	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИТ	- изотермическая амплификация
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
К-	- отрицательный контроль ОТ-ИТ
K1, K2	- положительные контроли ОТ-ИТ
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ИТ	- изотермическая амплификация с обратной транскрипцией
ПК	- персональный компьютер
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-	- 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-N501Y-ИТ предназначен для качественного определения мутации N501Y SARS-CoV-2 в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки) методом обратной транскрипции и изотермической амплификации (ОТ-ИТ). Материалом для ОТ-ИТ служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого биоматериала. Набор реагентов используется для скринингового исследования на наличие мутации N501Y в биологическом материале, содержащем РНК SARS-CoV-2, с последующим подтверждением наличия мутаций в гене S-белка методом секвенирования.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от пациентов с подтвержденным заболеванием 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 с мутацией N501Y 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 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».

ОТ-ИТ каждого образца проводится в двух пробирках. Существует зависимость между концентрацией РНК-мишени в исследуемом образце, наличием мутации и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для определения мутации N501Y вируса SARS-CoV-2 ОТ-ИТ исследуемых образцов РНК проводят одновременно с двумя положительными контролями. На основании сравнения значений Ct исследуемых образцов и положительных контролей, полученных с разными

реакционными смесями, определяется наличие или отсутствие мутации N501Y вируса SARS-CoV-2.

Аmplифицируемые кДНК-мишени и канал детекции флуоресценции указаны в табл. 1.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	
	ДНК-мишень	Область амплификации
SC2-ORF1	кДНК SARS-CoV-2	ген <i>ORF1ab</i>
SC2-N501Y	кДНК N501Y SARS-CoV-2	ген S-белка

ФОРМЫ КОМПЛЕКАЦИИ

Форма 1: «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.

Форма 1 рассчитана на проведение 200 реакций ОТ-ИТ, включая контроли. Объем контролей рассчитан на 10 независимых постановок.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, ГЭ (копий)/мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	«IT-комплект» вариант 200	1×10^4

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

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов определяет наличие мутации N501Y вируса SARS-CoV-2 при исследовании штамма hCoV-19/Russia/DAL-2512/2020(UK) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в концентрации не менее 1×10^4 ГЭ (копий)/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов в концентрации не более 1×10^8 ГЭ/мл и не менее 1×10^5 ГЭ/мл:

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США): *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 49619™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™), *Staphylococcus haemolyticus* (ATCC® 29970™), *Streptococcus agalactiae* (ATCC® 13813™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™), *Proteus mirabilis* (ATCC® 12453™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™), *Legionella pneumophila* (ATCC® 33152™), *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC® 43300™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 27736™), *Enterobacter cloacae* (ATCC® 13047™), *Bordetella pertussis* (ATCC® 9340™), *Haemophilus influenzae* (ATCC® 9006™), *Pneumocystis jirovecii* (ATCC® PRA-159™), *Candida albicans* (ATCC® 14053™), *Human Adenovirus 1* (ATCC® VR-1™), *Human Rhinovirus* (ATCC® VR-1663™), *Human Respiratory Syncytial Virus* (ATCC® VR-1540™), *Human Herpesvirus* (ATCC® VR-260™), *Human Enterovirus 71* (ATCC® VR-1432™);
- клинические образцы (специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей): SARS-CoV, MERS-CoV, *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Cytomegalovirus* (CMV), *Epstein-Barr virus* (EBV);
- ДНК человека в концентрации 10 мкг/мл.

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

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных по содержанию мутации N501Y модельных образцов.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах

короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Диагностические характеристики набора реагентов АмплиСенс® SARS-CoV-2-N501Y-IT

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	100 (96,4-100) %	100 (96,4-100) %

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

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».

патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и 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.

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 набор реагентов безопасен.

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

Сведения о безопасности набора реагентов 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 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Обратная транскрипция и изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- а) закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен,

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

- 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, SSIbio, 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.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 7. 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).

8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для проведения исследования служат пробы РНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2.

Допускается хранение образцов РНК SARS-CoV-2 до проведения ОТ-ИТ:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 30 мин;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – до года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортирование вышеперечисленного материала не допускается.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава набора реагентов и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на метод ОТ-ИТ:

- использование в качестве исследуемых образцов проб РНК, полученных ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, в которых уже была обнаружена РНК SARS-CoV-2;
- использование специфичных праймеров, комплементарных участкам выявляемых кДНК-мишеней;
- использование кДНК гена *ORF1ab* SARS-CoV-2 в качестве эндогенного внутреннего контроля.

Критерием отсутствия влияния потенциально интерферирующих веществ является наличие сигнала РНК гена *ORF1ab* по окончании реакции амплификации.

В виду указанных особенностей состава набора реагентов и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

IT-mix SC2-ORF1	Пробирка с крышкой	1,0	1 пробирка
IT-mix SC2-N501Y	Пробирка с крышкой	1,0	1 пробирка
IT-mix-E	Пробирка с крышкой	1,0	2 пробирки
IT SC2-N501Y	Пробирка с крышкой	0,2	1 пробирка
IT SC2-MIX-Y	Пробирка с крышкой	0,2	1 пробирка
C-	Пробирка с крышкой	0,2	1 пробирка

Электронный калькулятор на базе "Microsoft" Excel «АмплиСен® SC2-N501Y» – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.virocheck.ru).

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

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 SC2-ORF1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
IT-mix SC2-N501Y	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
IT-mix-E	Прозрачная жидкость от бесцветного до бледно-желтого цвета	1,0	2 пробирки
K1 SC2-N501Y	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 SC2-N501Y	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
C–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Электронный калькулятор на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® SC2-N501Y» – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

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

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для проведения исследования служат пробы РНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2.

Исследование состоит из следующих этапов:

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

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 двух реакционных смесей. На одну реакцию требуется: для одной реакционной смеси – 5 мкл IT-mix SC2-ORF1 и 5 мкл IT-mix-E; для второй реакционной смеси – 5 мкл IT-mix SC2-N501Y и 5 мкл IT-mix-E. Смесей готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на 2 реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением исследования.

2. Разморозить и перемешать содержимое пробирок с IT-mix SC2-ORF1 и IT-mix SC2-N501Y, осадить капли на вортексе. Содержимое пробирки IT-mix-E перемешать пипетированием, 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 двух отдельных пробирках приготовить две реакционные смеси. В одной пробирке смешать необходимое количество **IT-mix SC2-ORF1** и **IT-mix-E**; в другой пробирке – **IT-mix SC2-N501Y** и **IT-mix-E**. Тщательно перемешать, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных проб, поставить в два ряда.
5. В каждый ряд пробирок внести по одной из двух приготовленных реакционных смесей по **10 мкл** на пробу. Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.
6. В две пробирки с различными реакционными смесями 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 ОТ-ИТ (K1)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл K1 SC2-N501Y**;
 - б) **положительный контроль ОТ-ИТ (K2)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл K2 SC2-N501Y**;
 - в) **отрицательный контроль ОТ-ИТ (K–)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл С–**.

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 углам 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 в соответствии с табл. 6:

Таблица 6

Канал для флуорофора	FAM
Наименование IT-mix	Продукт амплификации
SC2-ORF1	кДНК SARS-CoV-2
SC2-N501Y	кДНК N501Y 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).

Анализируют значения пороговых циклов (Ct) образцов относительно значений пороговых циклов положительных

контролей, полученных на разных реакционных смесях, в соответствии с табл. 7, где

$$dK1_{ORF1} = (Ct K2_{ORF1} - Ct K1_{ORF1})/3$$

$$dK1_{N501Y} = (Ct K2_{N501Y} - Ct K1_{N501Y})/3$$

$$dK2_{ORF1} = (Ct K2_{ORF1} - Ct K1_{ORF1})/2 + 1$$

$$dK2_{N501Y} = (Ct K2_{N501Y} - Ct K1_{N501Y})/2 + 1$$

В случае, когда $dK2_{ORF1} \leq 3$ или $dK2_{N501Y} \leq 3$, результат считается **невалидным**, требуется повторить исследование.

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного исследования

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM		Результат
IT-mix SC2-ORF1	IT-mix SC2-N501Y	
$Ct \geq Ct_{\text{границное}}$ или отсутствует	$Ct \geq Ct_{\text{границное}}$ или отсутствует	РНК SARS-CoV-2 НЕ обнаружена
$Ct \geq Ct_{\text{границное}}$ или отсутствует	$Ct < Ct_{\text{границное}}$	Невалидный. Требуется повторить исследование
$Ct(K2) \leq Ct < Ct_{\text{границное}}$	$Ct \leq Ct(K1)$	Невалидный. Требуется повторить исследование
$Ct < Ct(K1)$	$Ct < Ct(K1)$	Мутация N501Y SARS-CoV-2 обнаружена
$Ct = Ct(K1) \pm dK1_{ORF1}$	$Ct = Ct(K1) \pm dK1_{N501Y}$	Мутация N501Y SARS-CoV-2 обнаружена
$Ct(K1) < Ct < Ct(K2)$	$Ct(K1) < Ct < Ct(K2)$	Мутация N501Y SARS-CoV-2 обнаружена
$Ct = Ct(K2) \pm dK2_{ORF1}$	$Ct = Ct(K2) \pm dK2_{N501Y}$	Мутация N501Y SARS-CoV-2 обнаружена
$Ct(K2) < Ct < Ct_{\text{границное}}$	$Ct(K2) < Ct < Ct_{\text{границное}}$	Мутация N501Y SARS-CoV-2 обнаружена
$Ct < Ct_{\text{границное}}$	$Ct \geq Ct_{\text{границное}}$ или отсутствует	Мутация N501Y SARS-CoV-2 НЕ обнаружена

Для всех остальных случаев, не указанных в табл. 7, мутация N501Y SARS-CoV-2 **не обнаружена**.

ВНИМАНИЕ! Дополнительные мутации в области посадки праймеров, обнаруживающих мутацию N501Y, могут приводить к ложноотрицательным результатам.

ВНИМАНИЕ! Анализ результатов проводить с помощью приведенного выше алгоритма или электронного калькулятора на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® SC2-N501Y». Работа электронного калькулятора осуществляется при использовании

программы Microsoft® Excel, входящей в состав приложений Microsoft® Office. Для начала работы необходимо скопировать файл электронного калькулятора с носителя или сайта Изготовителя на жесткий диск ПК. Порядок работы с электронным калькулятором, а также его назначение и характеристики описаны во вкладке «Инструкция» электронного калькулятора «АмплиСенс® SC2-N501Y».

Контроль качества исследования

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

Таблица 8

Результаты для контролей исследования

Контроль	Контролируемый этап исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM
K1	ОТ-ИТ	<u>определено меньше граничного</u>
K2	ОТ-ИТ	<u>определено меньше граничного</u>
K–	ОТ-ИТ	отсутствует или больше граничного

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ИТ (K1 или K2) значение порогового цикла (Ct) не определено или превышает граничное. Необходимо повторить исследование, начиная с этапа ОТ-ИТ, для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ОТ-ИТ (K–) определено значение порогового цикла (Ct) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. 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.

ВНИМАНИЕ! В процессе ИТ образуется больше продуктов амплификации, чем в ПЦР, поэтому требуется особая осторожность при работе с продуктами ИТ.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес³. 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.

Морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

³ Данные не подтверждены исследованиями в реальном времени.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

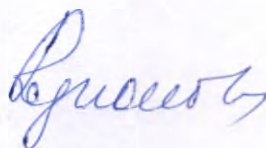
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

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.ru⁴.

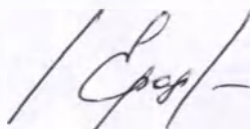
При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, 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

⁴ 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

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 22
(двадцать два) лист а



Руководитель подразделения развития и качества продукции
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)

07

2021 г.

Е.А. Козлова

М.П.

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 22 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.З.

