

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора
по научно-производственной деятель-
ности федерального государственного
бюджетного учреждения «Центр стра-
тегического планирования и управле-
ния медико-биологическими рисками
здоровью» Федерального медико-био-
логического агентства (ФГБУ «ЦСП»
ФМБА России).



Г.А. Шипулин

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК коронавируса
SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома
(COVID-19) методом полимеразной цепной реакции
с автоматической экстракцией РНК
«АмплиТест SARS-CoV-2 авто»



ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
119121, Российская Федерация,
г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТАЦИЯ.....	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	7
Воспроизводимость	9
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	18
СОСТАВ.....	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	20
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	21
А. Подготовка проб для амплификации	21
Б. Проведение амплификации 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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК-мишени (1 копия), содержащаяся в 1 геноме вируса
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
НК	- нуклеиновые кислоты
ПК	- положительный контроль экстракции ДНК, обратной транскрипции и ПЦР, включает фрагмент РНК SARS-CoV-2
К–	- отрицательный контроль ПЦР, не содержит фрагменты РНК SARS-CoV-2
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и ПЦР-амплификация
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИБ	- потенциально интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 6 ПК О РНК 2019-nCoV	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК SARS-CoV-2
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции с автоматической экстракцией РНК «АмплиТест SARS-CoV-2 авто», далее – набор реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 авто», предназначен для качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) в биологическом материале (мазках со слизистой носо- и ротоглотки) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике острых респираторных инфекций для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на коронавирусную инфекцию, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания. Специфическая патология – коронавирусное заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19).

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, выделенные из мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки с помощью набора реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» производства ООО «НекстБио», Россия (Р.У. № РЗН2019/8955) или набора реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р» производства ООО «НекстБио», Россия (Р.У. № РЗН 2020/12971).

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

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.

Комплектация данного набора реагентов предполагает экстракцию РНК из проб биологического материала с использованием частиц магнетизированной силики (магнитного сорбента), что позволяет автоматизировать процесс. Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот, в которых запрограммирована последовательность действий, изложенная в данной инструкции, а также в инструкции к набору «МагноПрайм ЮНИ», либо в инструкции к набору «МагноПрайм ФАСТ-Р». Использование автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот значительно упрощает и ускоряет процесс исследований при большом количестве проб.

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 (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР проводится пациентам с клинической симптоматикой респираторного заболевания, подозрительного на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, в особенности прибывающим из эпидемиологически неблагополучных регионов сразу после первичного осмотра, а также контактными лицам.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), с проведением на следующем этапе исследования реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО IC-R1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Экстракция РНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с Инструкцией по применению к набору реагентов для выделения НК в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО IC-R1). ВКО IC-R1 позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью ревертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем

измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

При исследовании одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции ОТ-ПЦР – амплификация кДНК SARS-CoV-2 коронавируса, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и кДНК ВКО IC-R1 регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО IC-R1	кДНК SARS-CoV-2
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена RdRP

КОМПЛЕКТАЦИЯ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F.

Предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК коронавируса SARS-CoV-2 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяет определять РНК коронавируса SARS-CoV-2 в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования рекомендуется использовать набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» производства ООО «НекстБио», Россия (РУ № РЗН 2019/8955), либо набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р» производства ООО «НекстБио», Россия (Р.У. № РЗН 2020/12971), в соответствии с Инструкциями производителя.

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 — Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»

Вид исследуемого материала	Экстракция	Комплект для ОТ-ПЦР	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки нос- и ротоглотки	Набор реагентов «МагноПрайм ФАСТ-Р»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F	1x10 ³
	Набор реагентов «МагноПрайм ЮНИ»		

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК штаммов коронавируса HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NI63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV из Европейского вирусного архива (European Virus Archive Global 011N-03868 - Coronavirus RNA specificity panel); штаммов вируса гриппа А (H1N1) (ATCC® VR-1469), вируса гриппа А (H3N2) (ATCC® VR-776) и вируса гриппа В (Victoria Lineage) (ATCC® VR-1930) из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США); штаммов *Streptococcus pneumoniae* (№ 131116), *Streptococcus pyogenes* (№ 130001), *Haemophilus influenza* (№ 151221), *Staphylococcus aureus* (№ 201108), *Klebsiella pneumoniae* (№ 180129) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в концентрации не менее 1x10⁶ ГЭ/мл.

При тестировании вышеперечисленных образцов положительных реакций (результатов) выявлено не было.

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО добавляется в каждый образец биологического материала

на этапе экстракции РНК. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы, объем, условия/срок хранения и транспортировки которых не соответствуют требованиям, указанным в разделе «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные – муцин, гемоглобин, и экзогенные – водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 % – вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой носо- и ротоглотки), используемом для исследования.

Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты испытываемым набором реагентов были протестированы модельные образцы, содержащие и не содержащие эндогенные и экзогенные потенциально интерферирующие вещества. Модельные образцы представляли собой мазки со слизистой носо- и ротоглотки, не содержащие РНК коронавируса SARS-CoV-2, контаминированные разведением стандартного образца предприятия СОП № 6 ПКОО РНК 2019-nCoV до конечной концентрации 1×10^4 ГЭ/мл, с последующим добавлением эндогенных (муцин, гемоглобин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %) ПИВ и без добавления данных веществ (см. табл. 2). Вычисляли разницу полученных средних значений C_t ($\Delta C_{t\text{ср.}}$) между контрольными и испытываемыми образцами. При значении $\Delta C_{t\text{ср.}}$ менее 1,5 циклов делали вывод об отсутствии влияния потенциально интерферирующих веществ на результат ОТ-ПЦР.

Экстракцию РНК из модельных образцов и ОТ-ПЦР проводили в соответствии с Инструкцией по применению.

Результаты тестирования представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ

Биологический материал	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мазки	Эндогенные вещества	Муцин	5 %	Не обнаружено
		Гемоглобин	100 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2 % (v/v)	Не обнаружено

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена для набора реагентов в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведение стандартного образца СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV с концентрацией 1×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован ОКО.

Экстракция РНК из образцов была проведена с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» совместно с автоматической станцией Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария), Р.У. № РЗН 2018/6981, а также с использованием набора реагентов «МагноПрайм ФАСТ-Р» совместно с автоматической станцией KingFisher Flex 24 с принадлежностями («Thermo Fisher Scientific», США), Р.У. № ФСЗ 2009/05562.

Результаты исследования для набора реагентов представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Воспроизводимость исследования для набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»

Тип образцов	Внутри постановки (повторяемость)		Между сериями		Между лабораториями (внутри серии)		Итого	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Экстракция РНК набором реагентов «МагноПрайм ЮНИ»								
Положительные СОП № 6 1×10^3 ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	24	100
Отрицательные	6	100	12	100	12	100	24	100
Экстракция РНК набором «МагноПрайм ФАСТ-Р»								
Положительные СОП № 6 1×10^3 ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	24	100
Отрицательные	6	100	12	100	12	100	24	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические показатели набора реагентов оценивали при анализе проб мазков со слизистой носо- и ротоглотки, предварительно охарактеризованных как содержащие и не содержащие коронавирус SARS-CoV-2.

Результаты применения набора реагентов представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Результаты оценки диагностических показателей набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»

Тип образцов	Характеристика образцов		Результаты применения набора реагентов	
Мазки из носо- и ротоглотки	Всего исследовано 163 образца	положительных	59	0
		отрицательных	0	104

Были использованы:

– 59 образцов биологического материала (мазков из носо- и ротоглотки), содержащих вирус SARS-CoV-2, полученных от пациентов с установленной инфекцией COVID-19;

– 104 образца биологического материала (мазков из носо- и ротоглотки), не содержащих РНК SARS-CoV-2.

Диагностические характеристики набора реагентов представлены в таблице 6.

Таблица 6 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)
Мазки из носо- и ротоглотки	93,9-100 %	96,5-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся ко II группе патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и 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». В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13 диагностика возбудителей инфекционных болезней II группы патогенности молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней" (с изменениями на 29 июня 2011 года). Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Орга-

низация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе необходимо всегда выполнять следующие требования: рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.
- Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку¹, биологический материал, включая 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, пить-

¹ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

евои 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 ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

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

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- 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 и при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Реагент для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков». (РУ № ФСР 2009/05515, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, или аналогичный).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
2. 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).
3. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс г (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ», РУ № РЗН 2019/8955 или набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р», РУ № РЗН 2020/12971 производства ООО НекстБио, Россия.
2. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, («Гамильтон Бонадуц АГ»)) Швейцария, Р.У. № РЗН 2018/6981), или процессор магнитных частиц KingFisher Flex 24 ("Thermo Fisher Scientific", США), Р.У. № ФСЗ 2009/05562), зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:
 - возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с Инструкцией по применению к набору реагентов «МагноПрайм ЮНИ» или с Инструкцией по применению к набору реагентов «МагноПрайм ФАСТ-Р»;

- наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнетизированной силики;
 - наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;
 - наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.
3. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя автоматической станции.
 4. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
 8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
 9. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
 - 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;
 - 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 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (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 или механические 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 (Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).
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 по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования от пациента рекомендуется брать следующий биологический материал:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой носоглотки 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 нижнего носового хода.

Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Для взятия мазков используют 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, делают вращательное движение 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 с задней стенки 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 материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Мазки со слизистой носо- и ротоглотки.

Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл образца.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК коронавируса SARS-CoV-2 в режиме «реального времени» включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количе-
«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F часть 1			
ПЦР смесь-FL SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,9	2 пробирки
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Тaq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F часть 2			
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 96 тестов), включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С; 2) температура хранения от 2 до 8 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации 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».

Экстракцию РНК проводят в соответствии с Инструкцией по применению к набору реагентов «МагноПрайм ЮНИ», либо в соответствии с Инструкцией по применению к набору реагентов «МагноПрайм ФАСТ-Р».

При экстракции РНК используют контрольные образцы этапов экстракции и ОТ-ПЦР.

В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПК О РНК SARS-CoV-2**.

В каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами в объеме **100 мкл**, внести по **10 мкл** внутреннего контрольного образца **ВКО IC-R1**.

При использовании станций для выделения НК с системой дозирования жидкостей, допускается предварительное смешивание исследуемых и контрольных (ОК и ПК) образцов (в объеме 100 мкл) с Буфером L. Реагент А, ВКО, и МГС добавляются к образцам в автоматическом режиме.

При использовании станций для выделения НК без системы дозирования жидкостей, к исследуемым и контрольным образцам (в объеме 100 мкл) добавляют предварительно подготовленную смесь, состоящей из Реагента А, МГС, ВКО и буфера L в соответствии с Инструкцией по применению набора реагентов.

По завершении процедуры экстракции НК элюировать пробы НК Буфером E1 в объеме от 100 до 150 мкл в случае использования набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ», или в объеме 100 мкл в случае использования набора «МагноПрайм ФАСТ-Р».

Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

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

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 50 мкл, включая объем пробы РНК – 25 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **15 мкл ПЦР-смеси-FL SARS-CoV-2, 10 мкл ПЦР-буфера-R, 1 мкл Taq полимеразы, 0,5 мкл Ревертазы (MMiv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 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.
В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL SARS-CoV-2, ОТ-ПЦР-буфера-R, Taq полимеразы, Ревертазы (MMiv)**, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
4. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

6. Поставить контрольные реакции.

а) **положительный контроль экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК SARS-CoV-2**.

б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К-**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы и контролей.

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

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

Таблица 7 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного² и планшетного³ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	10 мин		1
2	95	15 мин		1
3	95	10 с	FAM, JOE	45
	60	15 с		
	72	10 с		

² Rotor-Gene Q (QIAGEN)

³ CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технологии, Россия)

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 или стрипы (аналогичные используемым) 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

1. Анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам в соответствии с таблицей 1 настоящей инструкции.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 8).

Таблица 8 — Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	НЕ обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
отсутствует или опреде- лено больше граничного	отсутствует или опреде- лено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено 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. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации РНК в соответствии с таблицей 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 9 — Контроль достоверности этапов экстракции РНК, обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов (начиная с этапа экстракции РНК).
2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE и/или FAM. 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 ПЦР-исследование для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE. 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 ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), 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 (параметрах базовой линии), требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование.

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

Набор реагентов при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F, кроме контрольных образцов, хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Контрольные образцы (ОКО, ВКО IC-R1, ПКО РНК SARS-CoV-2) хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 хранить в защищенном от света месте.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты «ПЦР-комплекта» не более 3 раз.

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 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1, e-mail: promlab@cspmz.ru.

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

Руководитель
производственной лаборатории

Ж.Е.Тарасова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



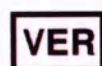
Номер по каталогу



Код партии



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Дата изменения



Температурный диапа-
зон



Изготовитель



Беречь от влаги



Осторожно! Обратитесь к
инструкции по
применению



Содержимого достаточно
для проведения n-
количества тестов



Использовать до



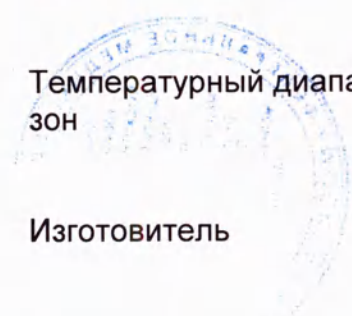
Обратитесь к инструкции
по применению



Не допускать воздей-
ствия солнечного света

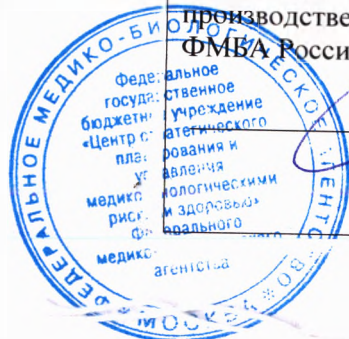


Дата изготовления



Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 28 лист

Зам. генерального директора по научно-
производственной деятельности ФГБУ «ЦСП»
ФМБА России



 Г.А. Шипулин