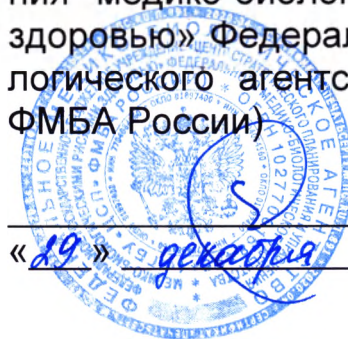


«УТВЕРЖДАЮ»

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

«19» декабря 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК коронавируса
SARS-CoV-2 генетических вариантов Omicron и Delta
на основе определения характерных для них мутаций
в S гене методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017



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	7
Воспроизводимость	8
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	9
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	16
СОСТАВ.....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	17
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ «ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	18
А. Подготовка проб для амплификации	18
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	20
В. Анализ и интерпретация результатов.....	20
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
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 РНК, 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 РНК
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПО	- программное обеспечение
РУ	- регистрационное удостоверение
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 генетических вариантов Omicron и Delta на основе определения характерных для них мутаций в S гене методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017 (далее – набор реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017) предназначен для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, генетических вариантов особого эпидемиологического значения (VOC) Omicron и Delta путем выявления характерных для данных вариантов мутаций в S гене коронавируса в образцах РНК, экстрагированной из биологического материала человека (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), в которых обнаружена РНК SARS-CoV-2 методом анализа нуклеиновых кислот.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике острых респираторных инфекций для исследования образцов РНК из биологического материала человека, полученного от лиц, у которых выявлена коронавирусная инфекция SARS-CoV-2 (COVID-19).

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, полученные путем экстракции комплектом реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РФ, РУ № РЗН 2020/12985, или набором реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р» производства ООО «НекстБио», РФ, РУ № РЗН 2020/12971, из биологического материала человека (мазки со слизистой носо- и ротоглотки), в котором была обнаружена РНК SARS-CoV-2 с помощью зарегистрированных в РФ наборов реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2.

Противопоказания 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.

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 (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК вируса SARS-CoV-2, включающих выявляемые мутации в гене S. Набор позволяет выявлять в гене S SARS-CoV-2 мутации A67V, del69-70, P681H, N679K сочетание которых характерно для генетического варианта Omicron (линий BA.1, BA.*, B.1.1.529), выявлять мутации P681R и L452R, сочетание которых характерно для генетического варианта Delta (линий B.1.617.2, AY.*) SARS-CoV-2, а также определять наличие каждой из указанных мутаций в отдельности.

С пробами РНК проводится обратная транскрипция (ОТ) 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».

Выявление мутаций коронавируса SARS-CoV-2 для одного образца проводится в двух пробирках. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 различным каналам: для ОТ-ПЦР-смеси 3-А по каналу для флуорофора ROX детектируется мутация P681H в сочетании с мутацией N679K в гене S, по каналу для флуорофора JOE детектируется фрагмент гена RdRP, обнаружение которого подтверждает наличие РНК SARS-CoV-2 в анализируемом образце; для ОТ-ПЦР-смеси 3-В по каналу для флуорофора FAM детектируются мутация A67V и делеция 69-70del в гене S, по каналу для флуорофора JOE - мутация L452R в гене S, по каналу для флуорофора ROX - мутация P681R в гене S (см. табл. 1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора / ОТ-ПЦР-смесь	Детектируемая РНК-мишень		
	FAM	JOE	ROX
3-A	-	фрагмент гена RdRP	мутации P681H и N679K в гене S SARS-CoV-2
3-B	мутация A67V и делеция 69-70del в гене S SARS-CoV-2	мутация L452R в гене S SARS-CoV-2	мутация P681R в гене S SARS-CoV-2

Выявление в препарате РНК SARS-CoV-2 сочетания мутаций P681H, N679K, A67V и 69-70del, характерного для линий Omicron, или сочетания мутаций L452R и P681R, характерного для линий Delta, интерпретируется как выявление генетических маркеров соответствующих линий SARS-CoV-2 – линий Omicron или линий Delta. В случае выявления одного из этих сочетаний мутаций рекомендуется провести дальнейшее исследование образца методом автоматического секвенирования кДНК для определения наличия спектра других генетических маркеров, которые в совокупности с указанными мутациями определяют принадлежность к соответствующим генетическим вариантам Omicron или Delta.

Исследование состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017.

Реагенты для экстракции РНК не включены в состав набора. Выделение РНК проводят с использованием наборов, зарегистрированных в установленном порядке в РФ.

КОМПЛЕКТАЦИЯ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F - комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК коронавируса SARS-CoV-2 (фрагментов гена S) для выявления мутаций, характерных для генетических вариантов Omicron и Delta, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Комплект реагентов рассчитан на проведение 200 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Набор реагентов рассчитан на проведение 100 определений.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 — Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017

Вид исследуемого материала	Комплект для ОТ-ПЦР	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Образцы РНК, полученные путем экстракции из биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки)	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	1x10 ³

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании штамма вируса SARS-CoV-2 № ГК2020/1 из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи», РНК штаммов коронавируса HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NI63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV (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, штаммов вируса парагриппа человека типов 1, 2, 3, риновируса человека 13, 17, 26 типов из Государственной коллекции

ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А.Смородинцева» Минздрава России в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл.

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

Для РНК штамма вируса SARS-CoV-2 № ГК2020/1 из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» фиксировался результат: не обнаружено РНК SARS-CoV-2 генетических вариантов Delta и Omicron (не обнаружено мутаций L452R, P681R, P681H, N679K, A67V и del69-70 в гене S SARS-CoV-2). Для всех образцов, не содержащих РНК SARS-CoV-2, получен результат: недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа.

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена для набора реагентов в двух независимых лабораториях, в разные дни, на различных приборах путем тестирования четырех положительных и одного отрицательного клинических образцов в пяти повторях. Дискордантных результатов не обнаружено.

Результаты для набора реагентов представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Воспроизводимость исследования для набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017

Тип образцов / Результат	Внутри постановки (повторяемость)		Между лабораториями (воспроизводимость)	
	Количество по- второв	Совпаде- ние резуль- татов, %	Количе- ство по- второв	Совпаде- ние резуль- татов, %
Образец № 1 Выявлены маркеры SARS-CoV-2 генетического варианта Delta	5	100	10	100
Образец № 2 Выявлены маркеры SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron	5	100	10	100
Образец № 3 Выявлены маркеры SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron	5	100	10	100
Образец № 4 НЕ выявлены маркеры генетических вариантов SARS-CoV-2 Omicron и Delta	5	100	10	100

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут находиться в пробе клинического материала или попасть в неё на этапе пробоподготовки и транспортирования клинического образца. Набор реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017 не используется на этапе пробоподготовки, предназначен только для анализа методом ОТ-ПЦР уже выделенных проб РНК. Для пробоподготовки применяются только зарегистрированные в РФ наборы реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, что позволяет получать РНК-пробы без существенного содержания потенциально интерферирующих веществ.

Для контроля эффективности проведения ОТ-ПЦР и наличия РНК SARS-CoV-2 в пробе в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция фрагментов РНК и амплификация соответствующей кДНК для специфической мишени коронавируса SARS-CoV-2 – фрагмента гена RdRP, который выполняет роль эндогенного внутреннего контрольного образца. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК участка гена RdRP, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и ПЦР и наличии РНК SARS-CoV-2, достаточного для анализа. При отсутствии сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК участка гена RdRP SARS-CoV-2, результаты анализа не интерпретируются, фиксируется результат «недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа», что служит для исключения ложноотрицательных результатов.

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для изучения диагностических характеристик были использованы:

- Образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащие РНК SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron – 32 образца;

- Образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащие РНК SARS-CoV-2 с мутациями, характерными для генетического варианта Delta, включая мутации P681R, L452R и T478K в S гене - 33 образца;

- Образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, содержащие РНК SARS-CoV-2 не относящихся к генетическим вариантам Omicron и Delta (без указанных мутаций в кодонах 452, 655, 681, 67 и 69-70 гена S) – 37 образцов.

В качестве системы сравнения было использовано сочетание следующих методов:

- применения набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 генетических линий Alpha, Beta / Gamma и Delta на основе определения характерных для них мутаций в S гене методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.2», серия CVGL4, производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2021/14054;

- полногеномное секвенирование кДНК SARS-CoV-2 (методом NGS) на платформе Illumina NextSeq 550 и секвенирование участков гена S по методу Сэнгера.

Результаты применения набора реагентов представлены в таблице 4.

Диагностические характеристики набора реагентов представлены в таблице 5.

Таблица 4 – Результаты тестирования набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017

Тип и количество образцов	Характеристика образцов	Результаты применения набора реагентов	
		Положительные (обнаружены маркеры соответствующих генетических вариантов)	Отрицательные (не обнаружены маркеры соответствующих генетических вариантов)
102 образца РНК, полученных путем экстракции из мазков из носо- и ротоглотки	Содержащие РНК SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron (с мутациями, характерными для варианта Omicron)	32	0
	Содержащие РНК SARS-CoV-2 генетического варианта Delta	33	0

Тип и количество образцов	Характеристика образцов	Результаты применения набора реагентов	
		Положительные (обнаружены маркеры соответствующих генетических вариантов)	Отрицательные (не обнаружены маркеры соответствующих генетических вариантов)
	(с мутациями, характерными для варианта Delta)		
	Содержащие РНК SARS-CoV-2, не относящихся к генетическим вариантам Delta и Omicron (без детектируемых мутаций в кодонах 452, 681, 69-70 и 67 гена S)	0	37

Таблица 5 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017

Характеристика		Результат
Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron	91,1 - 100%
	Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 генетического варианта Delta	91,3 - 100 %
Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)		92,2-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале коронавируса SARS-CoV-2 должны проводиться в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19» в редакции МР 3.1.074-20 с Изменениями № 1 от 30.04.2020. Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся ко II группе патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» 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 воз-

духу, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». 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- IV групп патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

К работе с тест-системами для диагностики COVID-19 в лаборатории организаций допускаются специалисты, давшие письменное согласие и прошедшие инструктаж, проведенный сотрудниками лабораторий Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний человека II группы патогенности.

Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость, обеспечивая в соответствии с таблицей методических рекомендаций МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19».

Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны рассматриваться как потенциально инфекционные, и медицинский персонал, который собирает или перевозит клинические образцы, должен строго соблюдать требования биологической безопасности как при работе с микроорганизмами II группы патогенности. Перевозка образцов должна осуществляться в соответствии с требованиями санитарного законодательства по отношению к микроорганизмам II группы патогенности.

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: 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 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных 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.

- 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 клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных 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

Обратная транскрипция и 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) 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) – 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) – при использовании прибора роторного типа.

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

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

6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).

7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имею-

- щий 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

Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала (мазков со слизистой носо- и ротоглотки), в которых была обнаружена РНК SARS CoV-2 методом анализа нуклеиновых кислот.

Допускается хранение материала мазков со слизистой носо- и ротоглотки до проведения исследования в течение 3 суток при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 7 суток, при температуре не выше минус 70°С - длительно, допускается однократное замораживание. Допускается хранение РНК, полученной из мазков, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более 7 суток, при температуре не выше минус 70°С - длительно, допускается однократное замораживание. Допускается транспортирование образцов РНК SARS CoV-2 при температуре от 2 до 8 °С в течение 4 часов.

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.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК коронавируса SARS-CoV-2 (фрагментов гена S) для выявления мутаций, характерных для генетических вариантов Omicron и Delta, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
ОТ-ПЦР-смесь-FL 3-A	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	1,1	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-FL 3-B	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	1,1	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Taq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
Часть 2			
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО Delta	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
ПКО Omicron	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 200 реакций обратной транскрипции и амплификации (всего 100 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 АНАЛИЗА

Анализ состоит из следующих этапов:

- выделение РНК;
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального

времени»,

- анализ и интерпретация результатов.

Выделение РНК проводят с использованием наборов реагентов для выделения РНК из биологического материала для дальнейшего проведения анализа с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот, зарегистрированных в установленном порядке в РФ.

Внимание! Полученный препарат РНК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с применением набора «АмплиТест® SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017. Допускается однократное замораживание и хранение препарата РНК при температуре не выше минус 16 °С не более 7 суток.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ РНК И АМПЛИФИКАЦИЯ кДНК 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 РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционных смесей. На одну реакцию требуется 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-FL 3-А, или ОТ-ПЦР-смеси-FL 3-В, 5 мкл ОТ-ПЦР-буфера-В, 0,5 мкл Taq полимеразы, 0,25 мкл Ревертазы (MMiv). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 6) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирки с ОТ-ПЦР-смесью-FL 3-А и ОТ-ПЦР-смесью-FL 3-В. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

В двух отдельных пробирках, маркированных 3-А, 3-В, подготовить две реакционные смеси. Смешать необходимое количество: **ОТ-ПЦР-смеси-FL 3-А**, или **ОТ-ПЦР-смеси-FL 3-В**, соответственно, **ОТ-ПЦР-буфера-Р**, **Taq полимеразы**, **Реввертазы (MMIv)**, осадить капли на вортексе.

3. Отобрать необходимое (двухкратное) количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб, поставить в три ряда.
4. Внести в каждый ряд пробирок по одной из двух приготовленных реакционных смесей по **15 мкл** на пробу. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В подготовленные пробирки внести по **10 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 ОТ-ПЦР (ПК Delta)** – в 2 пробирки с **реакционными смесями 3-А и 3-В** внести по **10 мкл ПКО Delta**.

б) **положительный контроль ОТ-ПЦР (ПК Omicron)** – в 2 пробирки с **реакционными смесями 3-А и 3-В** внести по **10 мкл ПКО Omicron**

в) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в 2 пробирки с **реакционными смесями 3-А и 3-В** внести по **10 мкл К-**.

г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в две пробирки с **реакционными смесями 3-А и 3-В** внести по **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО (ОК не является обязательным контролем).

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. 6).

Таблица 6 — Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов планшетного¹ и роторного² типа

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

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

Анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения для управления амплификаторами, используемыми для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам в соответствии с таблицей 1 настоящей инструкции.

¹ CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия)

² Rotor-Gene Q (QIAGEN)

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. 9).

Для анализа результатов **пороговая линия** устанавливается для каждого канала (для каждой смеси) на соответствующем уровне по отношению к конечному уровню графика флуоресцентного сигнала указанного ПКО (при использовании амплификаторов планшетного типа – табл.7) или на указанном уровне (при использовании амплификатора роторного типа – табл.8).

Таблица 7 – Значения пороговой линии для приборов планшетного типа

Наименование ОТ-ПЦР- смеси-FL	Канал для флуоро- фора	ПКО	Threshold / Пороговая ли- ния – уровень по отноше- нию к конечному уровню графика ПКО
3-A	JOE	ПКО Omicron	10-20% от конечного уровня указанного ПКО
	ROX		
3-B	FAM	ПКО Omicron	
	JOE	ПКО Delta	
	ROX		

Таблица 8 – Значения пороговой линии для приборов роторного типа

Наименование ОТ-ПЦР-смеси-FL	Канал для флуорофора	Threshold / Пороговая линия
3-A	JOE	0,1
	ROX	
3-B	FAM	0,1
	JOE	
	ROX	

Таблица 9 — Принципы интерпретации результатов

Наименование ОТ-ПЦР-смеси-FL	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			Результат
	FAM	JOE	ROX	
3-A	Не учитывается	определено	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружены мутации P681H и N679K в гене S
		<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Не обнаружено мутаций P681H и N679K в гене S
		отсутствует или определено больше граничного	отсутствует	Недостаточно PHK SARS-CoV-2 для анализа*
		отсутствует или определено	<u>определено</u> больше граничного	Сомнительный**
3-B	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружены мутации P681R и L452R в гене S
	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	Обнаружена делеция del69-70 и мутация A67V, НЕ обнаружены мутации P681R и L452R в гене S
	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Обнаружена мутация L452R в гене S, НЕ обнаружены мутации P681R, del69-70 и A67V
	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	Обнаружена мутация P681R в гене S, НЕ обнаружены мутации L452R, del69-70 и A67V
	отсутствует	отсутствует	отсутствует	НЕ обнаружены мутации P681R, L452R, del69-70 и A67V в гене S***
	определено больше граничного	отсутствует или определено	отсутствует или определено	Сомнительный**
	отсутствует	отсутствует или определено	определено больше граничного	
	отсутствует	определено больше граничного	отсутствует или определено	

* В случае получения результата **Недостаточно PHK SARS-CoV-2 для анализа** данная проба PHK не может быть проанализирована с помощью данного набора реагентов, поскольку содержание PHK SARS-CoV-

2 в ней ниже аналитической чувствительности набора реагентов или РНК SARS-CoV-2 отсутствует.

**** 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.**

***** Результат не учитывается в случае, если получен результат *Недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа* для ПЦР со смесью 3-А.**

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

Общие результаты по выявлению мутаций РНК SARS-CoV-2 в S гене представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Общий результат анализа

Результат с ОТ-ПЦР-смесью 3-А	Результат с ОТ-ПЦР-смесью 3-В	Общий результат анализа
НЕ обнаружены мутации P681H и N679K в гене S	НЕ обнаружены мутации P681R, L452R, del69-70 и A67V в гене S	НЕ обнаружена РНК SARS-CoV-2 генетических вариантов Delta и Omicron
Обнаружены мутации P681H и N679K в гене S	Обнаружена мутация del69-70 и A67V и, НЕ обнаружены мутации P681R и L452R	Выявлены маркеры SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron
Обнаружены мутации P681H и N679K в гене S	НЕ обнаружены мутации P681R и L452R, del69-70 и A67V	Выявлены маркеры SARS-CoV-2 генетического варианта Omicron (выявлены мутации P681H и N679K)
НЕ обнаружены мутации P681H и N679K в гене S	Обнаружены мутации P681R и L452R, НЕ обнаружены мутации del69-70 и A67V	Выявлены маркеры SARS-CoV-2 генетического варианта Delta
НЕ обнаружены мутации P681H и N679K в гене S	Обнаружена мутация P681R в гене S, НЕ обнаружены мутации L452R, del69-70 и A67V	НЕ обнаружена РНК SARS-CoV-2 генетических вариантов Delta и Omicron
НЕ обнаружены мутации P681H и N679K в гене S	Обнаружена мутация L452R в гене S, НЕ обнаружены мутации P681R, del69-70 и A67V	НЕ обнаружена РНК SARS-CoV-2 генетических вариантов Delta и Omicron
Недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа	НЕ обнаружены мутации del69-70, A67V, P681R и L452R в гене S	Недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа
Недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа	Обнаружены мутации P681R и L452R в гене S	Выявлены маркеры

Результат с ОТ-ПЦР-смесью 3-А	Результат с ОТ-ПЦР-смесью 3-В	Общий результат анализа
		SARS-CoV-2 генетического варианта Delta

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации участков кДНК в соответствии с табл. 11 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 11 — Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Наименование ОТ-ПЦР-смеси- FL	Контроль	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
3-А	ПКО Omicron	Не учитывается	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	ПКО Delta	Не учитывается	<u>определено</u> меньше граничного	Отсутствует
	К–	Не учитывается	Отсутствует	Отсутствует
3-В	ПКО Omicron	<u>определено</u> меньше граничного	Отсутствует	Отсутствует
	ПКО Delta	Отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
	К–	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (Ct) отсутствует или превышает граничное значение по каналам, на которых, согласно таблице 11, оно должно быть «определено меньше граничного». Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) или (и) ОК определено значение порогового цикла (Ct) по одному или нескольким каналам. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необ-

ходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов.

3. 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. 9 месяцев³. 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 суток в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

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

Хранение.

Часть 1 в составе реагентов ОТ-ПЦР-смесь-FL 3-А, ОТ-ПЦР-смесь-FL 3-В, ОТ-ПЦР-буфер-В, Таq полимераза, Ревертаза (MMiv), К- хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-FL 3-А, ОТ-ПЦР-смесь-FL 3-В хранить в защищенном от света месте.

Часть 2 в составе реагентов ОКО, ПКО Delta, ПКО Omicron хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

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

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

³ Первоначальный срок годности установлен методом ускоренной оценки стабильности.

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, г. Москва, Погодинская ул., дом 10 стр.1, e-mail: promlab@cspfmmba.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



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии (серия)



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



Беречь от влаги

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 28 лист 26

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



Г.А. Шипулин