

«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

2022 г.

« »



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

комплект реагентов

для проведения реакции обратной транскрипции

«АмплиТест® Реверта»



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
КОМПЛЕКТАЦИЯ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала	5
Воспроизводимость	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	11
СОСТАВ.....	12
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	12
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	14
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	15
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК/ДНК-мишени (1 копия), содержащаяся в 1 геноме вируса
МЕ	- единицы, указывающие количество РНК вируса гепатита С, нормированные относительно концентрации международных стандартных образцов NIBSC
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контроль экстракции РНК/ДНК
ОТ	- обратная транскрипция
ОКО	- отрицательный контрольный образец экстракции РНК/ДНК
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «АмплиТест® Реверта» предназначен для получения кДНК на матрице РНК, выделенной из биологического материала (мазков со слизистой носо- и ротоглотки, мокроты, плазмы крови, фекалий), для последующего исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Комплект реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для получения кДНК на матрице РНК с целью последующего исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

Противопоказания к применению - нарушение целостности упаковки, несоответствие внешнего вида реагента описанию, несоблюдение условий транспортирования и хранения согласно инструкции, истекший срок годности.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с комплектом 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»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Комплект реагентов используется для проведения реакции обратной транскрипции на матрице РНК из биологического материала, полученного от лиц вне зависимости от популяционной, демографической принадлежности к какой-либо расе или народности.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Реакция обратной транскрипции РНК, полученной из клинических образцов, осуществляется РНК-зависимой ДНК-полимеразой (*mut2*) в присутствии гексануклеотидных *random*-праймеров.

КОМПЛЕКТАЦИЯ

Комплект реагентов выпускается в одном варианте исполнения и рассчитан на получение кДНК на матрице РНК из 50 образцов, включая контроли

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного комплекта реагентов применимы следующие характеристики:

Специфическая активность

Результаты исследования специфической активности представлены в табл. 1.

Таблица 1 — Специфическая активность комплекта реагентов «АмплиТест® Реверта»

Наименование показателя	Норма
Тестирование набором реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ (Р.У. № РЗН 2014/1987)	
Результат при тестировании РНК коронавируса SARS-CoV-2 в разведении штамма коронавируса SARS-CoV-2 «ГК2020/1 1301/2» НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи до концентрации, соответствующей аналитической чувствительности набора 1×10^3 ГЭ/мл.	Контрольные реакции соответствуют заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора для проведения амплификации. Для образца обнаружена РНК вируса SARS-CoV-родственных вирусов (SARS-CoV, SARS-CoV-2): определено значение Ct менее граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE.
Тестирование набором реагентов «АмплиСенс® HCV-генотип-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ (Р.У. № № ФСР 2008/03147)	
Результат при тестировании РНК вируса гепатита С генотипа 2 образца контрольной панели «РНК вируса гепатита С» форма 4 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация (Р.У. № РЗН 2013/35), с концентрацией $5,32 \times 10^3$ МЕ/мл, соответствующей аналитической чувствительности набора 5×10^3 МЕ/мл.	Контрольные реакции соответствуют заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора для проведения амплификации. Для образца обнаружена РНК HCV генотипа 2: для реакционной смеси «1a/2» определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора JOE, отсутствие флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM; для реакционной смеси «ВКО/4» определено значение Ct менее граничного по каналу для флуорофора FAM, отсутствие флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора JOE; для реакционных смесей «1b/3a» и «5a/6» отсутствие флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

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® Реверта» не используется на этапе пробоподготовки, предназначен только для получения кДНК на матрице 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 процесса исследования рекомендуется использовать внутренний контрольный образец (ВКО). Если он предусмотрен в наборе для амплификации нуклеиновых кислот, ВКО добавляется в каждый исследуемый и контрольный образец согласно инструкции по применению набора реагентов для проведения амплификации. ВКО проходит все стадии экстракции и обратной транскрипции (ОТ) совместно с анализируемыми образцами. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора для проведения амплификации. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и амплификации.

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

Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования была определена в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой штамм коронавируса SARS-CoV-2 «ГК2020/1 1301/2» НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи с концентрацией 1×10^3 ГЭ/мл и образец контрольной панели «РНК вируса гепатита С» форма 4 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ, содержащей вирус гепатита С генотипа 2 в концентрации $5,32 \times 10^3$ МЕ/мл. В качестве отрицательных образцов был использован реагент ОКО из набора реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL». Анализ проводился с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ, и «АмплиСенс® HCV-генотип-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ.

Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2 — Воспроизводимость исследования

Тип образцов	Внутри постановки внутри серии (повторяемость)		Между сериями (повторяемость)		Между лабораториями внутри серии (воспроизводимость)		Итого воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные РНК SARS CoV-2 1×10^3 копий/мл	12	100	18	100	24	100	36	100
Положительные РНК HCV 5×10^3 МЕ/мл	12	100	18	100	24	100	36	100
Отрицательные	12	100	18	100	24	100	36	100

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль этапа обратной транскрипции РНК осуществляется одновременно с оценкой достоверности результатов этапа исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

Контроли обратной транскрипции РНК

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа образцов должна включать контрольные образцы (ВКО, ОКО, ПКО), если они предусмотрены для проведения тестирования согласно инструкции к используемому набору реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот:

- внутренний контрольный образец (ВКО) см. раздел «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала»;

- отрицательный контроль (ОКО) для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов и контроля контаминации. В качестве ОКО используют реагент, входящий в состав набора реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот;

- положительный контроль (ПКО), если он предусмотрен для проведения тестирования. В качестве ПКО используют реагент,

входящий в состав набора реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот:

Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в инструкции по применению набора реагентов для исследования методом амплификации нуклеиновых кислот.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся к I-IV группам патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» или 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) 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».

Диагностика возбудителей инфекционных болезней III-IV групп патогенности, а также 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 «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 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 следует проводить 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.

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

- Комплект реагентов готов к применению согласно инструкции. Применять комплект реагентов строго по назначению.

- К работе с комплектом 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 комплект реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать комплект реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать комплект 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 комплекта 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 комплект реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

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

2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).

4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).

6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки объемом 0,2 (0,5) мл (например, «Ахуген», США).

7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Ахуген», США).

8. Штативы для микропробирок объемом 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).

9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

10. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

11. Емкость с дезинфицирующим раствором.

СОСТАВ

«АмплиТест® Реверта» – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
RT-G-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,30	2 пробирки
Ревертаза (Mut2)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

«АмплиТест® Реверта» рассчитан на 50 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **0,4 мкл RT-G-mix, 10 мкл RT-mix, 0,5 мкл Ревертазы (Mut2)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирки с реагентами. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **RT-G-mix, RT-mix, Ревертазы (Mut2)**, осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество микропробирок или стрипов объемом 0,2 (0,5) мл для обратной транскрипции РНК исследуемых и контрольных проб.

5. Внести в микропробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

6. Используя наконечники с аэрозольным барьером, добавить по **10 мкл РНК-пробы** в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.

7. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой **37°C** на **30 мин.**

8. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза РНК-буфером (к **20 мкл кДНК** отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавить **20 мкл РНК-буфера**, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

Готовый препарат кДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 недели и при температуре не выше минус 68°C – до 1 года. Не рекомендуется хранить препарат кДНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °C.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 месяцев. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

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

Хранение. Комплект реагентов «АмплиТест® Реверта» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °C.

Холодильная камера должна обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик комплекта 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 комплекта реагентов направлять по адресу 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская улица, дом 10 стр.1, e-mail: promlab@cspfmmba.ru.

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



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги

ЛИСТ 8

О научной и ФГБУ «ЦСП» государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и медицинской помощи рисками здоровью» Федерального агентства по биологическому агентству

А. Шипулин