

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора
по научно-производственной деятель-
ности Федерального государственного
бюджетного учреждения «Центр
стратегического планирования и
управления медико-биологическими
рисками здоровью» Федерального
медико-биологического агентства
Российской Федерации (ФГБУ «ЦСП»
ФМБА России)

Г.А. Шипулин
« 18 » 05 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК коронавируса
SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома
(COVID-19) методом изотермической амплификации

«АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP»



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
КОМПЛЕКТАЦИЯ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	19
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	20
СОСТАВ.....	21
ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	22
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
А. Подготовка проб для амплификации	22
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	24
В. Анализ и интерпретация результатов.....	25
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	28
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	30

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 РНК, обратной транскрипции и LAMP, включает фрагмент РНК SARS-CoV-2
К-	- отрицательный контроль LAMP, не содержит фрагменты РНК SARS-CoV-2
LAMP	- изотермическая петлевая амплификация (loop-mediated amplification)
ОТ-LAMP	- обратная транскрипция и изотермическая петлевая амплификация
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2	- 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 Российской Федерации
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом изотермической амплификации «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP», далее – набор реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP», 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 изотермической петлевой амплификации (LAMP) с 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-LAMP служат пробы РНК, выделенные из мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки с помощью комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Р.У. № РЗН 2022/16452) или набора реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р» (Р.У. № РЗН 2020/12971) производства ООО «НекстБио», Россия (автоматическая экстракция РНК), или комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» (Р.У. № РЗН 2020/12985) производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (ручная экстракция РНК).

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.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом LAMP 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-L1), с проведением на следующем этапе исследования реакции обратной транскрипции РНК и изотермической петлевой амплификации (LAMP) участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО IC-L1 с флуоресцентной детекцией с помощью мишень-специфичного флуоресцентно-меченого праймера (для каждой мишени).

Экстракция РНК из образцов исследуемого материала производится в соответствии с Инструкцией по применению к комплекту/набору реагентов для выделения НК в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО IC-L1). ВКО IC-L1 позволяет контролировать все этапы исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты исследования, служит для исключения ложноотрицательных результатов.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью ревертазы и изотермическая петлевая амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам наборов праймеров и фермента Bst-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые праймеры, связанные с олигонуклеотидом с гасителем, которые связываются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, встраиваются в один из продуктов реакции, после чего при дальнейшей амплификации происходит вытеснение олигонуклеотида с гасителем и нарастание интенсивности флуоресценции от прикрепленного к праймеру флуорофора. Это позволяет регистрировать

накопление продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе реакции LAMP с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

При исследовании одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции ОТ-LAMP – амплификация кДНК SARS-CoV-2 коронавируса, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-L1. Результаты амплификации кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и кДНК ВКО IC-L1 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 SARS-CoV-2	кДНК ВКО IC-L1
Область амплификации	фрагмент гена RdRP	искусственно синтезированная последовательность

КОМПЛЕКТАЦИЯ

«LAMP-комплект» вариант FRT-96 F.

Предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяет определять РНК коронавируса SARS-CoV-2 в качественном формате. Для проведения полного исследования рекомендуется использовать комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России или набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р» производства ООО «НекстБио», Россия (автоматическая экстракция РНК), или комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (ручная экстракция РНК), в соответствии с инструкцией 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 LAMP»

Вид исследуемого материала	Набор реагентов для экстракции РНК	Комплект для ОТ-LAMP	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	«АмплиТест РИБО-преп»	«LAMP-комплект» вариант FRT-96 F	1x10 ³
	«МагноПрайм ФАСТ-Р»		
	«АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо»		

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 следующих типов препаратов в концентрации не менее 1x10⁶ ГЭ/мл:

- РНК штаммов SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV, HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NL63 (European Virus Archive Global 011N-03868 - Coronavirus RNA specificity panel);

- штаммов 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 influenzae* (№ 151221), *Staphylococcus aureus* (№ 201108), *Klebsiella pneumoniae* (№ 180129) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

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

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Интерферирующие вещества могут находиться в пробе биологического материала или попадать в неё на этапе пробоподготовки. Набор реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP» не используется на первом этапе экстракции нуклеиновых кислот из пробы биоматериала, предназначен только для следующего этапа – для анализа уже выделенной пробы РНК методом ОТ-LAMP. Для пробоподготовки рекомендуется применять только зарегистрированные в РФ наборы реагентов для экстракции нуклеиновых кислот.

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-LAMP 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 LAMP, и служит для исключения ложноотрицательных результатов исследования.

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 для набора реагентов в двух независимых лабораториях, в разные дни, на различных приборах путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 с концентрациями 1×10^4 и 1×10^3 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован ОКО.

Результаты для набора реагентов представлены в табл. 3.

Таблица 3 — Воспроизводимость исследования для набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP»

Тип образцов	Внутри постановки (повторяемость)		Между сериями		Между лабораториями		Итого	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Автоматическая экстракция РНК с использованием комплекта «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо»								
Положительные СОП № 7 1x10 ⁴ ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Положительные СОП № 7 1x10 ³ ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	12	100	18	100
Автоматическая экстракция РНК с использованием набора «МагноПрайм ФАСТ-Р»								
Положительные СОП № 7 1x10 ⁴ ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Положительные СОП № 7 1x10 ³ ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	12	100	18	100
Ручная экстракция РНК с использованием комплекта «АмплиТест РИБО-преп»								
Положительные СОП № 7 1x10 ⁴ ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Положительные СОП № 7 1x10 ³ ГЭ/мл	6	100	12	100	12	100	18	100
Отрицательные	6	100	12	100	12	100	18	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностические показатели набора реагентов оценивали на основании результатов, полученных при анализе проб мазков со слизистой носо- и ротоглотки, предварительно охарактеризованных как содержащие (62 образца) и не содержащие (105 образцов) коронавирус SARS-CoV-2 (от пациентов с признаками острых респираторных инфекций, инфекций нижних дыхательных путей и от клинически здоровых людей). В качестве набора сравнения был использован набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «МагниТест» по ТУ 21.20.23-096-26329720-2020 производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Р.У. № РЗН 2021/14279) с использованием для экстракции РНК комплекта реагентов «ПРОБА-НК-ПЛЮС» (Р.У. № ФСР 2010/08867) производства ООО «НПО ДНК-Технология». В качестве метода, подтверждающего наличие РНК SARS-CoV-2 в биологическом материале, для 3 дискордантных образцов было использовано полногеномное секвенирование кДНК вируса (с использованием секвенирующей платформы Illumina NextSeq 550, набора NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 циклов) (Illumina) и набора реагентов AmpliSeq Library PLUS (Illumina)).

В состав группы отрицательных, не содержащих РНК SARS-CoV-2 образцов, входили образцы от пациентов с выявленными различными возбудителями ОРВИ (при предварительном тестировании с помощью наборов реагентов, зарегистрированных в установленном порядке): 10 образцов с выявленной РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*); 5 образцов с выявленной РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*); 10 образцов с выявленной РНК вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus-1-4 – hPiv*); 10 образцов с выявленной РНК риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*); 5 образцов с выявленной ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus B, C, E – hAdv*); 1 образец с выявленной РНК метапневмовируса (*human Metapneumovirus – hMpv*); 8 образцов с выявленной РНК коронавирусов (*human Coronavirus – hCov*).

Так как случаи инфекции, вызванной вирусом MERS-CoV, не зафиксированы на территории Российской Федерации, случаи

инфекции, вызванной *Legionella pneumophila*, выявляются редко, а образцы, содержащие *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae type B*, вирус гриппа В (*Influenza virus B*), на момент проведения клинических исследований отсутствовали, биологических материал от пациентов с инфекциями, вызванными данными возбудителями, не был исследован в процессе клинических испытаний набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP»¹.

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 LAMP»

Тип образцов	Характеристика образцов		Результаты применения набора реагентов	
			положительные	отрицательные
Мазки из носоглотки	Всего исследовано 167 образцов	положительных	62	0
		отрицательных	0	105

Таблица 5 — Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)
Мазки из носоглотки	95,3-100	97,2-100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале COVID-19 должны проводиться в соответствии с методическими

¹ При проверке аналитической специфичности набора было показано отсутствие ложных положительных результатов в присутствии РНК MERS-CoV, ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae type B*, *Influenza virus B*.

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 воздуху, 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.
- 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.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком

годности, а также использованные реагенты, упаковку², 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, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты LAMP) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами LAMP 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 LAMP, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения LAMP-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 (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемио-

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

логические 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

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).

2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания).
3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).

Экстракция РНК из исследуемых образцов (ручная или автоматическая)

Ручная экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, РУ № РЗН 2020/12985.
2. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
3. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
8. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axugen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Axugen», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axugen», США).
11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например,

«ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).

12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Автоматическая экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Р.У. № РЗН 2022/16452).
2. Набор реагентов для экстракции РНК из биологического материала «МагноПрайм ФАСТ-Р» производства ООО «Некст-Био», Россия, РУ № РЗН 2020/12971.
3. Автоматическая станция для экстракции НК (например, дозирующая станция Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, («Гамильтон Бонадуц АГ») Швейцария, Р.У. № РЗН 2018/6981), зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:
 - возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с Инструкцией по применению к комплектам реагентов «МагноПрайм ФАСТ-Р» или «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо»;
 - наличие системы дозирования жидкостей в диапазоне от 100 до 500 мкл;
 - наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнетизированной силики;
 - наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 60 °С;
 - наличие системы перемешивания жидкостей шейкированием или пипетированием.
4. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя автоматической станции.
5. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).

7. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, изотермическая амплификация с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - закручивающиеся 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 пробирки 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», 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), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd. («Лайф Текнолоджис Холдингс Птс. Лтд»), Сингапур), РУ № РЗН 2019/8446, 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 оболочки 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

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Часть 1			
LAMP-смесь-FL SARS-CoV-2	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-розового цвета	1,1	1 пробирка
LAMP-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	1,1	1 пробирка
Bst полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
Ревертаза LAMP	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка
Часть 2			
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-L1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК SARS-CoV-2 L	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:

Часть 1 - температура хранения от минус 24 до минус 16 °С;

Часть 2 - температура хранения от 2 до 8 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Экстракцию РНК проводят в соответствии с Инструкциями по применению к набору реагентов «МагноПрайм ФАСТ-Р» производства ООО «НекстБио», Россия, или к комплектам реагентов «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, «АмплиТест РИБО-преп» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

При экстракции РНК используют контрольные образцы этапов экстракции и ОТ-LAMP:

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

Перед выделением внести в каждую пробирку (с исследуемыми и контрольными образцами) по 10 мкл внутреннего контрольного образца ВКО IC-L1.

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.

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 35 мкл, включая объем пробы РНК – 15 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл LAMP-смеси-FL SARS-CoV-2, 10 мкл LAMP-буфера-R, 1 мкл Bst полимеразы, 0,5 мкл Ревертазы LAMP.

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 LAMP-исследования. Рекомендуется использовать холодовой штатив для пробирки, в которой смешивается реакционная смесь, пробирок с Bst полимеразой и Ревертазой LAMP.

2. Разморозить пробирку с **LAMP-смесью-FL SARS-CoV-2**. Перемешать содержимое всех реагентов LAMP-комплекта:
 - содержимое пробирок с **LAMP-смесью-FL SARS-CoV-2** и **LAMP-буфером-R** перемешать на вортексе, осадить капли на вортексе для всех пробирок;
 - ферменты **Bst** полимеразу и **Ревертазы LAMP** аккуратно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **LAMP-смеси-FL SARS-CoV-2**, **LAMP-буфера-R**, **Bst** полимеразы, **Ревертазы LAMP**, тщательно перемешать пипетированием и осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для **OT-LAMP РНК** исследуемых и контрольных проб.
4. Внести в каждую пробирку по **20 мкл** приготовленной реакционной смеси.
5. В подготовленные пробирки внести по **15 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 OT-LAMP (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **15 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК SARS-CoV-2 L**.
 - б) **отрицательный контроль OT-LAMP (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **15 мкл К-**.

в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести **15 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

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

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-LAMP 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 амплификаторов роторного³ и планшетного⁴ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	62	2 мин	-	1
2	64	30 сек */ 40 сек**	FAM, JOE	35

* для амплификаторов CFX 96 (Bio-Rad) и Rotor-Gene Q (QIAGEN),

** для амплификаторов ДТпрайм (ДНК Технология) и QuantStudio 5 (Thermo Scientific)

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 Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁴ CFX 96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Thermo Scientific), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия).

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 прибора, используемого для проведения ОТ-ЛAMP 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)⁵ в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 7).

Таблица 7 — Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует или определено	Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
отсутствует	определено меньше граничного	НЕ обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено больше граничного	определено меньше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК.

⁵ При проведении изотермической реакции амплификации с детекцией в режиме «реального времени» цикл представляет собой условный цикл, в течение которого однократно определяется интенсивность флуоресцентного сигнала, отражающего накопление продукта амплификации, длительность цикла соответствует 30 секундам или 40 секундам согласно заданной программе амплификации и детекции.

**** В случае получения сомнительного результата необходимо провести повторное исследование соответствующего 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 C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

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

Таблица 8 — Результаты для контролей различных этапов исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-LAMP (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить исследование для всех образцов (начиная с этапа экстракции РНК).
2. Для отрицательного контроля ОТ-LAMP (К–) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM. Вероятна контаминация лаборатории продуктами ам-

плификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить 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 исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 7 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.

Часть 1 в составе реагентов LAMP-смесь-FL SARS-CoV-2, LAMP-буфер-R, Bst полимераза, Ревертаза LAMP, К- хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. LAMP-смесь-FL SARS-CoV-2 хранить в защищенном от света месте.

Часть 2 в составе реагентов ОКО, ВКО IC-L1, ПКО РНК SARS-CoV-2 L хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Допустимо размораживать и замораживать реагенты 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, 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



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 30 лист 06

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

Г.А. Шипулин





Краткое руководство

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом изотермической амплификации «АмплиТест® SARS-CoV-2 LAMP»

REF K-V005-L-FRT

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

IVD

VER

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории. Оно может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплект реагентов для экстракции:

«АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо» и «АмплиТест РИБО-преп» (производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) или «МагноПрайм ФАСТ-Р» (производства ООО «НекстБио», Россия)

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО IC-L1) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «АмплиТест® Магно-Сорб-Турбо», «АмплиТест РИБО-преп», «МагноПрайм ФАСТ-Р» добавить:

ВКО IC-L1	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПК РНК SARS-CoV-2 L	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

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

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

Общий объем реакционной смеси: 35 мкл, включая объем пробы РНК – 15 мкл.
Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный контроль экстракции РНК и ОТ-LAMP (ПК), 1 отрицательный контроль экстракции и РНК и ОТ-LAMP (ОК) и 1 отрицательный контроль ОТ-LAMP (К-).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирки реагентов «LAMP-комплект» **часть 1.**
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.
- Перемешать аккуратным пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
LAMP смесь-FL SARS-CoV-2	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
LAMP-буфер-R	10*(N+K+1)	
Bst полимеразы	1*(N+K+1)	
Ревертаза LAMP	0,5*(N+K+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением LAMP-исследования. Рекомендуется использовать холодовой штатив для пробирки, в которой смешивается реакционная смесь, пробирок с Bst полимеразой и Ревертазой LAMP.

Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-LAMP РНК исследуемых и контрольных проб:

Внести по 20 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 15 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК
Пробы, экстрагированной из ОКО	
Пробы, экстрагированной из ПКО РНК SARS-CoV-2 L	в пробирку для ПК
К-	в пробирку для К-

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

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

Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения следующей программы (для приборов роторного типа и планшетного типа).

Цикл	Программа амплификации			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	62	2 мин	-	1
2	64	30 сек*/ 40 сек**	FAM, JOE	35

для амплификаторов CFX 96 (Bio-Rad) и Rotor-Gene Q (QIAGEN),
для амплификаторов ДТпрайм (ДНК Технология) и QuantStudio 5 (Thermo Scientific)

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-LAMP с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК SARS-CoV-2 коронавируса	кДНК ВКО IC-L1
Область амплификации	фрагмент гена RdRP	искусственно синтезированная последовательность РНК

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 РНК значения порогового цикла (*Ct*).

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов юторного и планшетного типа и граничные значения *Ct*, необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Принципы интерпретации результатов см. в инструкции к набору реагентов.

Копия верна

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 3 лист а

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



 Г.А. Шипулин

СОГЛАСОВАНО

**Заместитель генерального директора
по научно-производственной
деятельности федерального
государственного бюджетного
учреждения «Центр стратегического
планирования и управления медико-
биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического
агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА
России)**

**Г.А. Шипулин
2021 г.**



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
стандартного образца предприятия № 7 «Положительный
контрольный образец, содержащий РНК SARS-CoV-2»
(СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2)**



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

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 7 «Положительный контрольный образец, содержащий РНК SARS-CoV-2» (СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2), предназначенного для проведения испытаний набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 LAMP» методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) с флуоресцентной детекцией.

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 и при постановке ПЦР следует соблюдать положения 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 всегда следует выполнять следующие требования:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно мыть руки по окончании работы.
- 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.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытуемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытываемого набора реагентов.

3.3 Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 и дать нагреться до комнатной температуры. СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 должен представлять собой прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений и посторонних примесей. Оценивают визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 перемешивают и осаждают капли на вортексе. Открывают пробирку и, используя наконечник с

аэрозольным барьером, отбирают необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрывают.

5.2 Готовят разведения, указанные в ТУ испытуемого набора реагентов с использованием РНК-буфера, приложенного к СОП. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10^5 ГЭ/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10^5 ГЭ/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10^5 ГЭ/мл.

Разведения готовятся по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, разводится N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение проводят согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N = A \quad (2)$$

$$C - A = B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 ГЭ/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем РНК-буфера, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m ГЭ/мл разводится последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ испытуемого набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, готовят последующие разведения, указанные в ТУ, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 имеет концентрацию 1×10^5 ГЭ/мл. Необходимо приготовить разведения СОП с концентрациями 2×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 ГЭ/мл:

- Маркируют пробирки « 2×10^4 », « 5×10^3 », « 5×10^2 »;

- В пробирку, маркированную « 2×10^4 », последовательно вносят автоматическим дозатором, используя наконечники с аэрозольным барьером, 980 мкл РНК-буфера и 20 мкл исходного СОП, тщательно перемешивают и осаждают на вихре.

- В пробирку, маркированную « 5×10^3 », последовательно вносят автоматическим дозатором, используя наконечники с аэрозольным барьером, 300 мкл РНК-буфера и 100 мкл из пробирки, маркированной « 2×10^4 », тщательно перемешивают и осаждают на вихре.

- В пробирку, маркированную « 5×10^2 », последовательно вносят автоматическим дозатором, используя наконечники с аэрозольным барьером, 450 мкл РНК-буфера и 50 мкл из пробирки, маркированной « 5×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вихре.

5.3 Далее проводится экстракция РНК SARS-CoV-2 из разведений СОП, обратная транскрипция и ПЦР, детекция продуктов ПЦР и учет результатов в соответствии с ТУ испытуемого набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2	0,1	1 пробирка
РНК-буфер	1,2	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП № 7 ПКО РНК SARS-CoV-2 соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВOK И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, дом 10, стр.1, e-mail: info@csrfmba.ru.

Копия верна

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 4 лист a

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



Г.А. Шипулин