«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. 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
«24» июля 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции

«АмплиТест SARS-CoV-2»

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

IVD

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
КОМПЛЕКТАЦИЯ 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала 7
Воспроизводимость 8
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК 18
СОСТАВ 20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 21
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 23
А. Подготовка проб для амплификации 23
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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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
ПК	- положительный контроль экстракции ДНК, обратной транскрипции и ПЦР, включает фрагмент РНК SARS-CoV-2
К–	- отрицательный контроль ПЦР, не содержит фрагменты РНК SARS-CoV-2
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и ПЦР-амплификация
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПИВ	- потенциально интерферирующие вещества
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СОП № 6	- стандартный образец предприятия, содержащий фрагмент РНК SARS-CoV-2
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

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

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике острых респираторных инфекций для исследования

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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).

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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), последующим проведении реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК выявляемого вируса и кДНК ВКО IC-R1 с гибридизационно-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

флуоресцентной детекцией. ВКО IC-R1 позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью ревертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

На этапе ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация кДНК SARS-CoV-2 коронавируса, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и кДНК ВКО IC-R1 регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

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

КОМПЛЕКТАЦИЯ

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F.

Набор реагентов предназначен для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РНК и амплификации участка кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяет определять РНК коронавируса SARS-CoV-2 в качественном формате.

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Таблица 2

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для ОТ-ПЦР	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота*	«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100	«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F	$1x10^3$
Фекалии*	«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100	«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F	$5x10^3$

*образцы после соответствующей предварительной обработки

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

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК штаммов коронавируса Human coronavirus 229E (ATCC® RV-740™), Betacoronavirus 1 OC43 (ATCC® VR-1558™), вируса гриппа A (H1N1) (ATCC® VR-1469), вируса гриппа A (H3N2) (ATCC® VR-776) и вируса гриппа B (Victoria Lineage) (ATCC® VR-1930) из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США), HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NI63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV (European Virus Archive Global 011N-03868 - Coronavirus RNA specificity panel), ДНК штаммов *Streptococcus pneumoniae* (№ 131116), *Streptococcus pyogenes*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(№ 130001), *Haemophilus influenza* (№ 151221), *Staphylococcus aureus* (№ 201108), *Klebsiella pneumoniae* (№ 180129) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в концентрации не менее $1x10^6$ ГЭ/мл.

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

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

Для контроля эффективности экстракции нуклеиновых кислот и ОТ-ПЦР в наборе реагентов предусмотрена одновременная обратная транскрипция РНК и затем амплификация кДНК коронавируса SARS-CoV-2 и внутреннего контрольного образца (ВКО). ВКО добавляется в каждый образец биологического материала на этапе экстракции РНК. В ходе реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО, говорит об отсутствии ингибирования ОТ и ПЦР.

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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные – муцин, гемоглобин, и экзогенные - водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %, «Ибупрофен» (суппозитории ректальные 60 мг), «Эффералган®» (суппозитории ректальные 80 мг) - вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой носо- и ротоглотки, мокрота, фекалии), используемом для исследования.

Для изучения влияния потенциально интерферирующих веществ (ПИВ) на полученные результаты, испытуемым набором реагентов были протестированы модельные образцы, содержащие и не содержащие эндогенные и экзогенные потенциально интерферирующие вещества. Модельные образцы представ-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ляли собой мазки со слизистой носо- и ротоглотки, образцы мокроты, фекалий, не содержащие РНК коронавируса SARS-CoV-2, контаминированные разведением СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV до конечной концентрации $1x10^4$ ГЭ/мл, с последующим добавлением эндогенных (муцин, гемоглобин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %, «Ибупрофен» суппозитории 60 мг, «Эффералган®» суппозитории 80 мг) ПИВ и без добавления данных веществ. Вычисляли разницу полученных средних значений Ct ($\Delta Ct_{ср.}$) между контрольными и испытуемыми образцами. При значении $\Delta ct_{ср.}$ менее 1,5 циклов делали вывод об отсутствии влияния потенциально интерферирующих веществ на результат ОТ-ПЦР.

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

Результаты тестирования представлены в табл. 3.

Таблица 3

Биологический материал	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мокрота, мазки	Эндогенные вещества	Муцин	5%	Не обнаружено
		Гемоглобин	100 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлор-гексидина биглюконата	2% (v/v)	Не обнаружено
Фекалии	Эндогенные вещества	Муцин	5%	Не обнаружено
		Гемоглобин	100 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	«Ибупрофен» суппозитории	2% (v/v)	Не обнаружено
		«Эффералган®» суппозитории	2% (v/v)	Не обнаружено

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 разведения стандартного образца предприятия СОП № 6 ПКО РНК 2019-nCoV с концентрациями $1x10^3$ и $1x10^4$ ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован ОКО.

Результаты для набора реагентов представлены в табл. 4.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4

Воспроизводимость исследования

Тип образцов	Внутри постановки внутри серии (повторяемость)		Между сериями (повторяемость)		Между лабораториями (воспроизводимость)		Итого, воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные СОП № 6 $1x10^3$ ГЭ/мл	6	100	24	100	24	100	36	100
Положительные СОП № 6 $1x10^4$ ГЭ/мл	6	100	24	100	24	100	36	100
Отрицательные	6	100	24	100	24	100	36	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Таблица 5

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2»

Тип образцов	Характеристика образцов		Результаты применения набора реагентов	
Мазки из носо- и ротоглотки	Всего исследовано 113 образцов	положительных	50	0
		отрицательных	0	63
Мокрота	Всего исследовано 103 образца	положительных	50	0
		отрицательных	0	53
Фекалии	Всего исследовано 100 образцов	положительных	50	0
		отрицательных	0	50

Были использованы:

- 150 образцов биологического материала (мазков из носо- и ротоглотки, мокроты, фекалий), содержащих вирус SARS-CoV-2, полученных от пациентов с установленной инфекцией COVID-19;
- 166 образцов биологического материала (мазков из носо- и ротоглотки, мокроты, фекалий), не содержащих РНК SARS-CoV-2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 6

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2»

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)
Мазки из носо- и ротоглотки	94,2-100 %	95,3-100 %
Мокрота	94,2-100 %	94,5-100 %
Фекалии	94,2-100 %	94,2-100 %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней, относящихся ко II группе патогенности, должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

биологического материала как инфекционно-опасные; инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.
- Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[1], биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 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 или аналогичный).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Реагент «МУКОЛИЗИН» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
3. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

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. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axygen», США).
10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например. Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (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), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования от пациента рекомендуется брать следующий биологический материал:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки (при наличии симптомов поражения верхних дыхательных путей),
- мокрота (при наличии симптомов поражения нижних дыхательных путей),
- фекалии (при наличии симптомов поражения ЖКТ).

ВНИМАНИЕ! Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки рекомендуется совмещать в одной пробирке и исследовать как

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 вискозными 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 вискозным 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 вискозными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вискозным 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Мокрота.

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно.

Фекалии.

Образцы забирают в стерильный горшок или подкладное судно. Затем в количестве 1 г (примерно) переносят в одноразовую герметичную емкость из полипропилена. Допускается хранение до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

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.

Мокрота.

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с мокротой добавляется реагент «МУКОЛИЗИН» в соотношении объемов 2:1 (ориентируясь по градуировке емкости). При необходимости увеличивают объем реагент «МУКОЛИЗИН» до соотношения 5:1. После инкубации при комнатной температуре до просветления мокроты (не более 20 минут) 100 мкл мокроты используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предварительная обработка фекалий.

В микроцентрифужную пробирку (объемом 1,5 мл) вносят 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии (10%). Взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии.

Центрифугируют суспензии фекалий 5 мин при 7000 g (10 тыс об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf). Супернатант (осветленный экстракт фекалий) в объеме 20 мкл используют для экстракции РНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОСТАВ

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

К комплекту реагентов «АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапов экстракции РНК/ДНК из биологического материала и ОТ-ПЦР:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количе-
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

«АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 рассчитан на выделение РНК из 100 образцов, включая контроли.

«ПЦР-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	Количе-
ПЦР смесь-FL SARS-CoV-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,9	2 пробирки
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Taq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Реагенты комплектов упакованы раздельно.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,

- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-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».

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО IC-R1**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО IC-R1, внести по **100 мкл** подготовленных проб (для экстрактов фекалий внести **20 мкл** проб и 80 мкл фосфатного буфера (или стерильного физиологического раствора)), используя наконечники с аэрозольным барьером. 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***.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65°С** в термостате.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**

7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.

8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.

10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.

13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 90 мкл.

16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **15 мкл ПЦР-смеси-FL SARS-CoV-2, 10 мкл ПЦР-буфера-R, 1 мкл Taq полимеразы, 0,5 мкл Ревертазы (MMlv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL SARS-CoV-2**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL SARS-CoV-2, ОТ-ПЦР-буфера-R, Taq полимеразы, Ревертазы (MMlv),** осадить капли на вортексе.

3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
4. Внести в каждую пробирку по **25 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
5. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

6. Поставить контрольные реакции.
   а) **положительный контроль экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК *SARS-CoV-2***.
   б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–.**
   в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

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

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

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

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

Таблица 7

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[2] и планшетного[3] типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	**50**	30 мин		1
2	**95**	15 мин		1
3	**95**	15 с		45
	60	30 с	**FAM, JOE**	
	72	15 с		

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

---

[2] Rotor-Gene Q (QIAGEN)

[3] CFX 96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Life Technologies), ДТпрайм («ДНК Технология»)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

Таблица 8

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

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*) в соответствующей графе таблицы результатов.

Принципы интерпретации результатов следующие:

Таблица 9

Значение порогового цикла (*Ct*) по каналу для флуорофора		**Результат**
FAM	**JOE**	
определено меньше граничного	отсутствует	**НЕ обнаружена** РНК коронавируса SARS-CoV-2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Возможные ошибки:

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев[4]. 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 разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 F хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2 хранить в защищенном от света месте. Допустимо размораживать и замораживать реагенты «ПЦР-комплекта» не более 3 раз.

Комплект «АмплиТест РИБО-преп» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

[4] Первоначальный срок годности установлен методом ускоренной оценки стабильности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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, ул. Погодинская, дом 10, стр.1, e-mail: info@cspfmba.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

Зам. главного врача по лабораторному делу ФГБУЗ ГЦГиЭ ФМБА — К.Б.Колбутова

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии	Σ	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления
	Беречь от влаги		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru