

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

«18» марта 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome *coronavirus*) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome *coronavirus*), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® Cov-Bat-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	11
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	15
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	19
СОСТАВ.....	22
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК.....	26
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	27
А. Подготовка пробирок для амплификации	27
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	28
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	33
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	34
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	35
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец для наборов реагентов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
ВОЗ	- всемирная организация здравоохранения
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	- желудочно-кишечный тракт
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОРЗ	- острые респираторные заболевания
ОТ	- обратная транскрипция
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ТОРС	- тяжёлый острый респираторный синдром
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» предназначен для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome *coronavirus*) и SARS-Cov-родственных вирусов (Severe acute respiratory syndrome *coronavirus*, Severe acute respiratory syndrome *coronavirus*-2), методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» может быть использован для исследования биологического материала вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для исследования объектов окружающей среды (концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды) с целью профилактики коронавирусной инфекции человека.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2), вызывающих тяжелую респираторную инфекцию, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию РНК из образцов исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции и амплификацию участка кДНК данного коронавируса с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

Экстракция РНК из исследуемого материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Отдельно используется положительный контроль экстракции и обратной транскрипции РНК (ПК) – пробирка, в которую добавляется неинфекционный рекомбинантный препарат ПКО MERS-Cov / SARS-Cov, и отрицательный контроль экстракции РНК (ОК) – пробирка, в которую добавляется препарат ОКО.

Реакция обратной транскрипции проводится с целью образования комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК. Затем с полученными пробами кДНК проводится реакция амплификации участков области *npE* генома коронавируса MERS-Cov и гена *Pol* SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) при помощи специфичных к этим участкам кДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых мишеней кДНК, 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».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически

модифицированной Taq-полимеразы. Химически модифицированная полимераза (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 6 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «РЕВЕРТА-L» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F.

Примечание – Форма 5 удалена.

Формы комплектации 1, 2 и 7 предназначены для проведения амплификации кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Форма комплектации 7 представляет собой укрупненную форму комплектации 2.

Формы комплектации 3, 4 и 6 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, реакцию обратной транскрипции и амплификацию кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов

(SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации 6 представляет собой укрупненную форму комплектации 4.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Возбудитель	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность ¹ , ГЭ/мл
Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки, плазма крови, мокрота	MERS-Cov	РИБО-преп	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-50 F	1x10 ³
	SARS-Cov	РИБО-преп	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-50 F	1x10 ³
Фекалии	MERS-Cov	РИБО-преп	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при постановке на амплификаторе роторного типа	1x10 ³
	SARS-Cov	РИБО-преп	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при постановке на амплификаторе роторного типа	1x10 ³
Фекалии	MERS-Cov	РИБО-преп	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-50 F при постановке на амплификаторе планшетного типа	1x10 ⁴
	SARS-Cov	РИБО-преп	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-50 F при постановке на амплификаторе планшетного типа	1x10 ⁴

Аналитическая специфичность

Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании положительного контрольного образца РНК коронавируса MERS-Cov (*hCov-EMC upE-Assay: IVT-RNA*), рекомендованного ВОЗ для скринингового исследования (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre,

¹ Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 / **VER** 18.03.21 / стр. 6 из 36

Германия), и РНК коронавируса SARS, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром – ТОРС (University of Frankfurt, Германия).

Показано отсутствие активности компонентов набора реагентов в отношении следующих штаммов коронавирусов: коронавируса кошек – FC0 и FC1, коронавируса собак – CCV, коронавируса, вызывающего инфекционный бронхит кур – ИБК «Чапаевский», ИБК МВА-6, ИБК Н-120, ИБК АМ, М-41. Неспецифических реакций с коронавирусами, изолятами основных возбудителей ОРЗ человека (Cov-E229, Cov-OC43, Cov-НКUI, Cov-NL63), а также с кДНК/ДНК штаммов и изолятов основных возбудителей ОРЗ человека (вирусы гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа, риновирусов, бокавируса, аденовирусов, энтеровирусов, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*), нормальной микрофлоры полости носа и ротоглотки человека и кДНК/ДНК человека не отмечалось.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты тестирования характеристик набора реагентов:

Описание образцов	Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL»
Биологический материал, содержащий ² РНК коронавируса MERS-Cov	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Положительные 100 %
	Мокрота	100 шт	Положительные 100 %
	Плазма крови	100 шт	Положительные 100 %
	Фекалии	100 шт	Положительные 100 %
Биологический материал, содержащий ² РНК коронавируса SARS-Cov	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Положительные 100 %
	Мокрота	100 шт	Положительные 100 %
	Плазма крови	100 шт	Положительные 100 %
	Фекалии	100 шт	Положительные 100 %

² В качестве образцов, содержащих коронавирусы MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2), использовались модельные образцы биологического материала, содержащие рекомбинантные стандартные образцы предприятия.

Описание образцов	Тип образцов	Количество образцов	Результативность применения набора реагентов «АмплиСенс® Cov-Bat-FL»
Биологический материал, содержащий ² РНК коронавируса SARS-Cov-2	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	51 шт	Положительные 100 %
	Мокрота/аспираты из трахеи		
	Бронхоальвеолярный лаваж		
	Плазма крови		
	Фекалии		
	Секционный материал		
Биологический материал, не содержащий ³ РНК коронавирусов MERS-Cov, SARS-Cov	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	100 шт	Отрицательные 100 %
Биологический материал, не содержащий ³ РНК коронавируса SARS-Cov-2	Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки	56 шт	Отрицательные 100 %
	Мокрота/аспираты из трахеи		
	Бронхоальвеолярный лаваж		
	Плазма крови		
	Фекалии		
	Секционный материал		
Объекты окружающей среды, содержащие ⁴ РНК SARS-Cov-2	Концентраты образцов воды	50 шт	Положительные 100 %
	Смывы с объектов окружающей среды		
Объекты окружающей среды, не содержащие ⁴ РНК SARS-Cov-2	Концентраты образцов воды	55 шт	Отрицательные 100 %
	Смывы с объектов окружающей среды		

В соответствии с представленными данными диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении РНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov для

³ В качестве образцов, не содержащих коронавирусы MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2), использовались образцы биологического материала от больных ОРВИ, содержащие вирус гриппа A/H1N1pdm2009, вирусы парагриппа, и риновирусы, что было доказано при тестировании с наборами реагентов «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (ПУ № ФСР 2009/05010), «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» (ПУ № ФСР 2009/05143) и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ПУ № ФСР 2011/11258).

⁴ Образцы объектов окружающей среды получены из референс-центра по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций Роспотребнадзора.

всех типов биологического материала составляет 98-100 % с доверительной вероятностью 90 %.

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении РНК коронавируса SARS-Cov-2 составляет 100% (93-100 %) с доверительной вероятностью 95 %.

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении РНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov составляет 98-100 % с доверительной вероятностью 90 %.

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении РНК коронавируса SARS-Cov-2 составляет 100% (94-100 %) с доверительной вероятностью 95 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»⁵, СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Перед началом работ следует ознакомиться с Методическими указаниями МУ 1.3.1877-04 «Порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторного анализа биологического материала от больных

⁵ В соответствии с п.2.1.6 СП 1.3.3118-13, диагностика молекулярно-генетическими методами (без накопления возбудителя) по детекции в клиническом материале возбудителей инфекционных болезней может проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с микроорганизмами III группы патогенности в соответствии с требованиями санитарных правил "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами", утвержденных постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 28.01.2008 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 21 февраля 2008 г. N 11197). Исследования по детекции нуклеиновых кислот проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии с 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».

(и умерших) пациентов с подозрением на тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)», утвержденными Роспотребнадзором.

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.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности формы комплектации 1, 2 и 7 набора реагентов безопасны.

При использовании по назначению форм комплектации 3, 4 и 6 набора реагентов и соблюдении вышеперечисленных мер

предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов и Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁶, биологический материал, 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» и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие и предварительная подготовка исследуемого материала

1. Реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- Роспотребнадзора.
- 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; рН=7,5±0,2).
 - Реагент для предобработки слизистого материала – «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
 - Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
 - Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (503CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
 - Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).
 - Одноразовая игла (диаметр 0,8–1,1 мм) и вакуумная система типа Venoject (с ЭДТА) или Vacuette (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА) для получения плазмы крови.
 - 0,9 % раствор натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатный буфер, рН 7,0 – для предварительной подготовки секционного материала и фекалий.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

- Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1, 2 и 7.
- Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
4. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия, или аналогичный)).
10. Одноразовый флакон на 10–20 мл.
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
13. Емкость для сброса наконечников.

Проведение реакции обратной транскрипции

1. Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (РУ № ФСР 2008/03994) или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1, 2 и 7.
2. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С

(например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный) или амплификатор (например, MaxyGene Gradient (Ахуген, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США, или аналогичный)).

4. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
5. Электронные или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 100 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 (0,5) мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Штативы для наконечников и пробирок объемом 0,2 (0,5) мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
11. Емкость для сброса наконечников.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, ООО «Биохит», Россия).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 100, 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

8. Емкость для сброса наконечников.
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции, (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)), iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
10. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл – при работе с «ПЦР-комплектами» варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F:
 - а) 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) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Биологический материал

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и СП 1.3.2322-08.

Для исследования от пациента рекомендуется брать не менее двух типов биологического материала (материал из респираторного тракта, плазма крови и, при наличии

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 / **VER** 18.03.21 / стр. 15 из 36

симптомов поражения ЖКТ, фекалии):

- мазки со слизистой носоглотки и задней стенки ротоглотки (при наличии симптомов поражения верхних дыхательных путей),
- мокрота (либо аспираты из трахеи) (при наличии симптомов поражения нижних дыхательных путей),
- бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов (если пациент интубирован),
- плазма крови,
- фекалии (при наличии симптомов поражения ЖКТ),
- секционный материал (фрагменты пораженной части легких, бронхов) в случае летального исхода.

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. Мазки у детей и взрослых берут сухим стерильным назофарингеальным вельюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. 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 (3–4 см для детей и 5–6 см для взрослых). После забора материала конец зонда с тампоном опускают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда.

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 / **VER** 18.03.21 / стр. 16 из 36

Пробирку герметично закрывают и маркируют.

Для взятия мазков у взрослых допустимо использовать 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 из 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.

Мокрота или аспират из трахеи. Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой. Аспираты из трахеи получают традиционным способом и помещают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры. 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.

Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов. Образцы собирают в одноразовые плотно закручивающиеся емкости из полипропилена объемом не менее 5 мл. 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.

Секционный материал. Образцы помещают в стерильные одноразовые контейнеры и исследуют в течение 1 ч либо замораживают сразу после взятия. Допускается хранение до проведения исследования в течение 7 сут при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Плазма крови. Для получения плазмы взятие крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в вакуумную систему типа Venoject (с ЭДТА) или Vacuette (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА). Пробирку аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 3 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Для экстракции РНК используют 100 мкл образца плазмы.

Хранить плазму крови можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес при температуре от минус 24 до минус 16 °С, в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

Допускается однократное замораживание-оттаивание клинического материала.

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 однократное замораживание-оттаивание материала.

Объекты окружающей среды

Материалом для исследования служат:

- концентраты образцов воды,
- смывы с объектов окружающей среды.

Концентраты образцов воды (для проведения ПЦР-исследования)

Взятие образцов воды производится в соответствии с МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» и МУК 4.2.1018-01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» или актуальными версиями данных документов, действующими на территории Российской Федерации на момент проведения исследований.

Смывы с объектов окружающей среды

Образцы берут зондами с тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором. Площадь смыва с плоской поверхности составляет 5-10 см². Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, верхнюю часть зонда отламывают и удаляют.

Для экстракции РНК используют 100 мкл образца.

Допускается хранение образцов объектов окружающей среды до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование образцов объектов окружающей среды при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл,

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 / **VER** 18.03.21 / стр. 19 из 36

наконечников с фильтрами и других материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

Мазки со слизистой носоглотки 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 или аспират из трахеи. Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке реагентом «МУКОЛИЗИН». С целью снижения вязкости в емкость с мокротой добавляется равное количеству мокроты количество реагента «МУКОЛИЗИН». 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.

Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов. Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

Секционный материал. Образец гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 10 тыс об/мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

Предварительная обработка фекалий. К образцу фекалий (объемом до 1,0 мл (по 0,4–1,0 г)) добавляют 4,0 мл физиологического раствора до образования 10–20 % суспензии (фекалии водянистой консистенции могут использоваться без приготовления суспензии). Взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии.

Полученную суспензию фекалий осветляют одним из двух способов:

1. Центрифугирование суспензии фекалий 20 мин при 3 тыс об/мин. Супернатант (осветленный экстракт фекалий) используют для экстракции РНК.
2. Проведение экспресс фильтрации суспензии фекалий. Для экспресс-фильтрации используют два наконечника объемом 1 мл (один с фильтром, другой – без фильтра) и полистироловую палочку с ватным наконечником (например, палочку для ушей). Предварительно следует подготовить систему фильтрации: от ватной палочки отрезается кончик с ватой, который вставляется в наконечник без фильтра и проталкивается с помощью другого чистого наконечника до упора в его суженную часть. Автоматической пипеткой объемом 1 мл с наконечником с фильтром забирается 0,5 мл фекальной суспензии, наконечник с суспензией плотно до упора вставляется в подготовленный наконечник с ватной вставкой. Фильтрация суспензии проводится из наконечника пипетки с фильтром через наконечник с ватной вставкой в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл под давлением поршня пипетки. В случае затруднений при фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию суспензии фекалий. Полученный фильтрат в количестве 0,05 мл используют для экстракции РНК.

Допустимо хранение осветленного экстракта фекалий в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

СОСТАВ

«РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем, мл	Кол-во	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁷	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 6.

«РЕВЕРТА-L» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

Реагент	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем, мл	Кол-во	Объем, мл	Кол-во
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	5 пробирок	0,01	10 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок	0,125	10 пробирок
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

⁷ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на проведение 120 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 6.

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагментов кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-А	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 3.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 2, 4.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов кДНК коронавирусов MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

амплификации, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 6.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов кДНК коронавируса MERS-Cov и SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	1 пробирка
К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок
ВКО STI-87-гес	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
ПКО MERS-Cov / SARS-Cov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 7.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов;
- обратная транскрипция;
- амплификация кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК коронавируса,

Формат FRT Форма 1: **REF** H-2241-1-2; Форма 2: **REF** H-2242-1; Форма 6: **REF** НК1-2246-1;

Форма 7: **REF** H-2247-1 / **VER** 18.03.21 / стр. 25 из 36

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome *coronavirus*) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome *coronavirus*), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Cov-Bat-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Для экстракции РНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракция РНК проводится из 100 мкл подготовленных образцов объектов окружающей среды и биологического материала за исключением фекалий. При работе с фекалиями для экстракции РНК используется подготовленная суспензия, состоящая из 50 мкл ОКО и 50 мкл фекалий.

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-87-rec**). В качестве положительного контроля экстракции и обратной транскрипции РНК используется 90 мкл ОКО и 10 мкл **ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**. В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используется 100 мкл ОКО.

Для проведения реакции обратной транскрипции используется комплект реагентов «**РЕВЕРТА-L**», рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с данным комплектом реагентов см. в инструкции к комплекту реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 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 кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-А**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в приготовленную пробирку **10 мкл К–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в приготовленную пробирку **10 мкл К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, экстрагированной из образца **ОКО**.
 - г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, экстрагированной из образца **ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**.

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

A2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F
Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL MERS-Cov / SARS-Cov**, **ПЦР-буфером-В** и **полимеразой (TaqF)** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1–2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-FL MERS-Cov / SARS-Cov**, **5*(N+1) мкл ПЦР-буфера-В**, и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**. (Расчетную таблицу приготовления реакционных смесей см. в Приложении 1).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл К–**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл К+ MERS-Cov / SARS-Cov / STI**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, экстрагированной из образца **ОКО**.
 - г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, экстрагированной из образца **ПКО MERS-Cov / SARS-Cov**.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

детекции в режиме «реального времени») для выполнения амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации

Цикл	Приборы роторного типа ⁸			Приборы планшетного типа ⁹		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для вариантов FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F)	1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для вариантов FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с		54	25 с	
		детекция флуоресц. сигнала			детекция флуоресц. сигнала	
72	10 с	72	25 с			

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM¹⁰, JOE¹⁰ и ROX¹⁰.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! Перед установкой в амплификатор планшетного типа необходимо осадить капли со стенок пробирок кратковременным (1–3 с) центрифугированием на центрифуге/вортексе.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁸ Например, Rotor-Gene 3000/Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁹ Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

¹⁰ Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК **ВКО**.
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК **SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2)**.
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК **MERS-Cov**.

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 кДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- РНК вируса **MERS-Cov обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла (C_t), не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- РНК **SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2) обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t), не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

- РНК вируса **MERS-Cov** и **SARS-Cov-родственных вирусов (SARS-Cov, SARS-Cov-2)** не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров ROX и JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t), а значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофоров JOE или ROX, и по каналу для флуорофора FAM значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов рекомендовать повторный сбор материала для анализа.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофоров ROX или JOE превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение, а значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора FAM не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов или получении значения порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров ROX или JOE менее граничного, образец считать положительным.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Cov-Bat-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

СОСТАВ. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции и обратной транскрипции РНК в соответствии с табл. 2.

Таблица 2
Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t , по каналу флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция, ОТ-ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция, ОТ-ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля экстракции (ПК) или для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора **FAM**, **JOE** или **ROX** отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая РНК, соответствующая данному флуорофору.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) по каналу для флуорофора **JOE** или **ROX** и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора **FAM**, **JOE** или **ROX** определено значение порогового цикла (C_t), необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена РНК вируса, соответствующего данному флуорофору.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Для форм комплектации 1 и 3 (вариант FRT) – 9 мес. Для форм комплектации 2, 4, 6 и 7 (варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F) – 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Хранение. «РИБО-преп», «ПЦР-комплекты» варианты FRT, FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov, ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) (из «ПЦР-комплектов» варианты FRT-50 F, FRT-100 F, FRT-200 F) хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL MERS-Cov / SARS-Cov хранить в защищенном от света месте. «РЕБЕРТА-L» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

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 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹¹.

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 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.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

¹¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

LOT

Код партии



Использовать до

IVD

Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению

VER

Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель

ПРИЛОЖЕНИЕ 1**Расчетная таблица приготовления реакционных смесей
для проведения амплификации для «ПЦР-комплекта»
вариант FRT-50 F**

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реагентов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ¹²	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
6	60	30	3,0
8	80	40	4,0
10	100	50	5,0
12	120	60	6,0
14	140	70	7,0
16	160	80	8,0
18	180	90	9,0
20	200	100	10,0
22	220	110	11,0
24	240	120	12,0
26	260	130	13,0
28	280	140	14,0
30	300	150	15,0
32	320	160	16,0

**Расчетная таблица приготовления реакционных смесей
для проведения амплификации для «ПЦР-комплектов»
варианты FRT-100 F, FRT-200 F**

Объем реагента на одну реакцию, мкл	Объем реагентов на указанное количество реакций		
	10,0	5,0	0,5
Число реакций ¹²	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
110	1100	550	55
220	2200	1100	110

¹² Число исследуемых образцов (N), включая 2 контроля этапа экстракции РНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на 1 образец (N+2+2+1).