




Инструкция по применению набора реагентов расположена на сайте www.amplisens.ru

Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL

Форма 1:	REF НК1-4091-1-1
Форма 2:	REF НК3-4092-1-1
Форма 3:	REF НК3-4093-1-1
Форма 4:	REF Н-4094-1-1



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

VER 18.02.21

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп» вариант 100;
- «МАГНО-сорб» вариант 100 и вариант 100М.

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


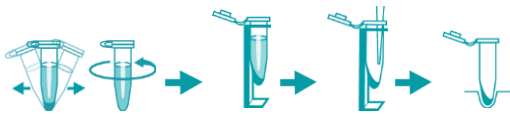

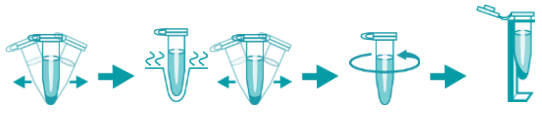
Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 положительный контроль экстракции (ПК), 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

ЭКСТРАКЦИЯ РНК С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИХ СТАНЦИЙ

Допустимо проведение экстракции РНК с помощью автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа» (станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей) (например, MicroLab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария), KingFisher Flex (Thermo FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия)). Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматических станций, с использованием соответствующего протокола экстракции и с соблюдением следующих условий:




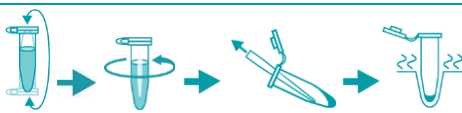
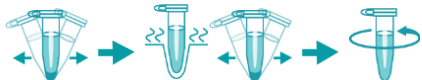
Условие	Станции «открытого типа»
Набор для экстракции	«МАГНО-сорб» вариант 100 или вариант 100М
Объем исследуемых и контрольных образцов	должен быть увеличен до 110 мкл (с учетом запаса) (для фекальных/ректальных мазков: 55 мкл биоматериала + 55 мкл ОКО)
Объем ВКО-FL	по 10 мкл на один образец
Объем элюции	100 мкл

ЭКСТРАКЦИЯ РНК С ПОМОЩЬЮ «МАГНО-сорб» вариант 100 и вариант 100М

В отдельной стерильной пробирке подготовить смесь:		
Компонент	Объем, мкл	Обозначения
ВКО-FL	10x(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей экстракции; 1 – запас
Компонент А	10x(N+K+1)	
Магнетизированная силика	20x(N+K+1)	
Внести в пробирки:		
Образец/реагент	Объем	Действие
Смесь ВКО-FL, компонента А, магнетизированной силики	40 мкл	добавить в каждую пробирку
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	900 мкл	добавить в каждую пробирку
Мазки со слизистой оболочки носоглотки, мокрота / аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал, концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	100 мкл	добавить в пробирки для исследуемых образцов
Фекальный / ректальный мазок, плазма крови + ОКО	50 мкл + 50 мкл	
ОКО + ПКО SARS-CoV-2	90 мкл + 10 мкл	добавить в пробирку для ПК
ОКО	100 мкл	добавить в пробирку для ОК
Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:		
		<ul style="list-style-type: none"> - перемешать на вортексе; - поместить в термостат на 10 мин при 60 °С, осадить капли; - открыть крышки, перенести в магнитный штатив на 2 мин; - осторожно отобрать надосадочную жидкость; - перенести пробирки в обычный штатив
Раствор для отмывки 6	700 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> - закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе, осадить капли; - открыть крышки, перенести в магнитный штатив на 2 мин; - осторожно отобрать надосадочную жидкость; - перенести пробирки в обычный штатив
Раствор для отмывки 7	200 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> - закрыть крышки, ресуспендировать на вортексе, осадить капли; - открыть крышки, перенести в магнитный штатив на 1 мин; - осторожно отобрать надосадочную жидкость; - высушить с открытыми крышками на магнитном штативе в течение 10 мин
Буфер для элюции	100 мкл	добавить в каждую пробирку
		<ul style="list-style-type: none"> - перемешать на вортексе; - поместить в термостат на 5 мин при 60 °С, через 2 мин перемешать на вортексе, - осадить капли, переставить в магнитный штатив на 2 мин
Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК		

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной РНК для проведения ОТ-ПЦР осуществляется не снимая пробирок с магнитного штатива. Рекомендуется проведение ОТ-ПЦР сразу после экстракции РНК.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК С ПОМОЩЬЮ «РИБО-преп» вариант 100

Образец/реагент	Объем	Действие
ВКО-FL	10 мкл	добавить в каждую пробирку
Раствор для лизиса	300 мкл	добавить в каждую пробирку
Мазки со слизистой оболочки носоглотки, мокрота / аспират из зева, бронхоальвеолярный лаваж / промывные воды бронхов, аутопсийный материал, концентраты образцов воды, смывы с объектов окружающей среды	100 мкл	добавить в пробирки для исследуемых образцов
Фекальный / ректальный мазок, плазма крови + ОКО	50 мкл + 50 мкл	
ОКО + ПКО SARS-CoV-2	90 мкл + 10 мкл	добавить в пробирку для ПК
ОКО	100 мкл	добавить в пробирку для ОК
Все пробирки с исследуемыми и контрольными образцами:		
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе, осадить капли; - прогреть 5 мин при 65 °С ;
Раствор для преципитации	400 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе; - центрифугировать 5 мин при 12 тыс g ; - осторожно удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 3	500 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, промыть осадок переворачиванием; - центрифугировать в течение 1-2 мин при 12 тыс g ; - осторожно удалить надосадочную жидкость
Раствор для отмывки 4	200 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, промыть осадок переворачиванием; - центрифугировать 2 мин при 12 тыс g ; - осторожно удалить надосадочную жидкость; - открыть крышки, подсушить осадок 5 мин при 65 °С
РНК-буфер	100 мкл	добавить в каждую пробирку
		- закрыть крышки, перемешать на вортексе; - поместить в термостат на 5 мин при 65 °С , периодически перемешивая на вортексе; - центрифугировать 1 мин при 12 тыс g
Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК		

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется проведение ОТ-ПЦР сразу после экстракции РНК.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОТ-ПЦР С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F и вариант FRT-100M F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы РНК (10 мкл).

Контроли: 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL SARS-CoV-2.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL SARS-CoV-2	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	
Ревертаза-Н	$0,25 \cdot (N+K+1)$	
RT-G-mix-2	$0,25 \cdot (N+K+1)$	

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

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР исследуемых проб и контролей.

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб РНК, экстрагированных из исследуемых и контрольных образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ПК, ОК При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!

ВНИМАНИЕ! При получении новой серии набора реагентов необходима постановка положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+, К-). Постановка К+ рекомендуется для проверки работы амплификаторов и в других случаях внутрилабораторного контроля. Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ SARS-CoV-2**. При подозрении на возможную контаминацию в лаборатории необходима постановка К-. Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.

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

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси с РНК-пробами и контролями.

ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

Цикл	Программа амплификации для приборов роторного типа				Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	20 мин	–	1	50	20 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5	95	10 с	–	5
	60	20 с	–		60	20 с	–	
4	95	10 с	–	40	95	10 с	–	40
	60	20 с	FAM, JOE		60	20 с	FAM, JOE	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

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

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», с помощью алгоритма, приведенного в инструкции к набору реагентов или электронного калькулятора на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® COVID-19».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Мишень для амплификации	кДНК ВКО-FL	кДНК SARS-CoV-2

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (C_t), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.