

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов «КовидЭк Экстракт» для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ТУ 21.20.23-120-70423725-2021

№ РЗН 2021.15949 от 08.12.2021 года

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «КовидЭк Экстракт» для выделения и качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, предназначен для выделения и качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в препаратах нуклеиновых кислот (анализируемые образцы), выделенных из проб клинического материала, полученных при взятии мазка из носа, носоглотки и/или ротоглотки человека, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Функциональное назначение набора реагентов «КовидЭк Экстракт» - ранняя диагностика коронавируса SARS-CoV-2 для предотвращения дальнейшей передачи инфекции.

Набор адаптирован для работы на зарегистрированных в Российской Федерации амплификаторах планшетного и роторного типов: «CFX96» («Bio-Rad Laboratories Inc.»); «ДТ 96», «ДТ Лайт» (ООО «НПО ДНК-Технология»); Applied Biosystems QuantStudio 5 («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.»); Rotor-Gene Q («Qiagen»).

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Метод исследования состоит из нескольких этапов: выделение РНК SARS-CoV-2, реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени».

Метод очистки суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов для выделения РНК основан на осаждении нуклеиновых кислот спиртовым раствором с последующей промывкой осадка для удаления нежелательных примесей и растворением в буфере с низкой ионной силой (*метод преципитации*).

Выделенная РНК SARS-CoV-2 подвергается обратной транскрипции с помощью ревертазы. Участки полученной кДНК амплифицируют при помощи специфичных к данным участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В состав реакционной смеси включены флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды (ДНК-зонды). Данные ДНК-зонды, содержащие флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой к ДНК-мишени. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, воздействие гасителя на флуоресцентную метку прекращается. В результате происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Количество разрушенных зондов увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Нарастающий уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

3. СОСТАВ

Набор реагентов «КовидЭк Экстракт» состоит из реагентов для выделения вирусной РНК и амплификационной части:

3.1 Таблица 1. Реагенты для выделения РНК

Компонент	Объем
1. Высаливающий раствор	1 флакон-30 мл
2. Осаждающий раствор	1 флакон-110 мл
3. Промывочный раствор	1 флакон-100 мл
4. Элюирующий раствор	1 флакон-15 мл

3.2 Таблица 2. Реагенты для ОТ-ПЦР-амплификации

Компонент	Объем
1.ОТ-ПЦР-реагент	1 пробирка-0,5 мл
2. Праймеры COVID-19	1 пробирка-1 мл
3.ПКО	1 пробирка -0,2 мл
4.ОКО	1 пробирка- 1,0 мл

Внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе является **эндогенным** и представляет собой ген РНКазы Р человека. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала (эпителиальных клеток из верхних дыхательных путей).

Набор рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

1. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 - 1.1 Аналитическая чувствительность (предел обнаружения РНК коронавируса человека SARS-CoV-2) составляет **10³ геном-эквивалентов в 1 мл** анализируемого образца;
 - 1.2 Диагностическая чувствительность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2, проверенная на 100 положительных образцах, составляет 100%;
 - 1.3 Диагностическая специфичность выявления РНК коронавируса человека SARS-CoV-2, проверенная на 100 отрицательных образцах, составляет 100%;
 - 1.4 Аналитическая специфичность набора реагентов была определена посредством исследования образцов нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций: вирусы гриппа А и В, парагрипп, аденовирусная инфекция, респираторно-синцициальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека (MERS-CoV, HKU1, 229E, OC43, NL63, SARS-CoV), Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenza type B, Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae. Перекрестных реакций не выявлено.
2. НЕОБХОДИМЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ
 - 2.1 Бокс биологической безопасности класса защиты ПА;
 - 2.2 Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл с возможностью термостатирования при 65 °С;
 - 2.3 Микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл со скоростью вращения не менее 12 000 об/мин;
 - 2.4 Амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени» (например, CFX96, ДТ-96, QuantStudio 5; Rotor Gene Q);
 - 2.5 Оптические пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
 - 2.6 Мини-центрифуга-вортекс;
 - 2.7 Набор дозаторов переменного объема (1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл);

- 2.8 Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема*;
- 2.9 Одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл*;
- 2.10 Штативы для пробирок и наконечников;
- 2.11 Холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- 2.12 Отдельный халат и одноразовые перчатки;
- 2.13 Ёмкость для сброса наконечников;
- 2.14 Комплект средств для обработки рабочего места.

Примечание *При работе с РНК необходимо использовать микропробирки и наконечники, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования осуществляется в соответствии с существующими ТНПА, методическими рекомендациями и инструкциями. Исследуемые образцы непосредственно перед выделением РНК тщательно гомогенизируют на вортексе, капли материала с внутренней части крышки убирают кратковременным центрифугированием при минимальных скоростях.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК

Установить температуру на термостате 65 °С.

В случае выпадения осадка в Высаливающем и/или Осаждающем растворах растворить кристаллы интенсивным встряхиванием, допускается прогревание раствора до температуры 37 °С для лучшего растворения кристаллов.

4.1 В каждую пробирку внести по **300 мкл Высаливающего раствора**.

4.2 Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца**

При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), добавить 100 мкл Элюирующего раствора или ОКО (отрицательного контрольного образца). ОКЭ рекомендуется ставить при каждой постановке выделения.

4.3 Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 мин при температуре 65 °С.

4.4 Добавить в пробирки по **600 мкл Осаждающего раствора**, перемешать на вортексе в течение 10 с, инкубировать 30 с при комнатной температуре.

4.5 Центрифугировать в течение 5 мин при 12 000 об/мин.

4.6 Не задевая осадок аккуратно удалить надосадочную жидкость.

4.7 Добавить в пробирки по **500 мкл Осаждающего раствора**, промыть осадок, переворачивая пробирки 3–5 раз.

4.8 Центрифугировать в течение 1 мин при 12 000 об/мин.

4.9 Не задевая осадок аккуратно удалить надосадочную жидкость

4.10 Внести в пробирки с осадком по **1 000 мкл Промывочного раствора**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3–5 раз.

4.11 Центрифугировать в течение 1 мин при 12 000 об/мин.

4.12 Не задевая осадок аккуратно удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Для наилучшего удаления надосадочной жидкости рекомендуется: дать пробе постоять при комнатной температуре в течение 30–60 с и отобрать отстоявшуюся надосадочную жидкость повторно.

4.13 Инкубировать пробирки с открытыми крышками в термостате в течение 5 мин при температуре 65 °С для подсушивания осадка.

4.14 Добавить в пробирки по 50 мкл Элюирующего раствора, перемешать на вортексе. При необходимости допускается увеличение объема Элюирующего раствора до 150 мкл.

4.15 Инкубировать пробы в термостате в течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном (рекомендуется) или периодическом перемешивании. Допускается краткосрочное перемешивание на вортексе.

4.16 Центрифугировать пробирки в течение 1 мин при 12 000 об/мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК, готовую для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

4.17 Для хранения образцов рекомендуется перенести надосадочную жидкость в новые пробирки. Допускается хранение образцов в течение суток при температуре не выше 4 °С или в течение 1 года при температуре не выше минус 16°С.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 ПОДГОТОВКА ПЦР-СМЕСИ

Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

5.1.1 В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

5.1.2 В пробирке объемом 1,5-2 мл приготовить «Мастер Микс»:

$5 \cdot (N+1)$ мкл ОТ-ПЦР-реагента + $10 \cdot (N+1)$ мкл праймеров

где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

5.1.3 Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

5.1.4 В подготовленные пробирки добавить по 10 мкл образца выделенной РНК.

5.1.5 Поставить контрольные точки амплификации:

К- – внести в пробирку 10 мкл ОКО;

К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКО.

ОКЭ – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ

5.1.6 Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием
ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

5.2 Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор и запустить прибор со следующими параметрами амплификации*:

Таблица 3. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/Yellow**	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

* Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для всех каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5F1 и «MaxReading/Максим. Сигнал» – 10F1.

** На амплификаторе Quant Studio 5 во вкладке «Plate» - «Advanced Setup» в качестве канала детекции SARS-CoV-2 необходимо выбрать VIC (соответствует каналу HEX по длинам волн флуоресценции).

5.3 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Флуоресцентный сигнал амплификации специфического фрагмента вируса SARS-CoV-2 регистрируется по каналу HEX, флуоресцентный сигнал амплификации внутреннего контроля (ВКО) регистрируется по каналу FAM.

Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene»*:

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 5%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0–30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02–0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Kоррек. Уклона*».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96»*:0

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25–500**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

г) для приборов «Quant Studio 5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 15 000 для каналов FAM и VIC

* в зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.

** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 4.

Таблица 4. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow
ОКО	ПЦР	Не детектируется	Не детектируется
ПКО	ПЦР	≤35	≤35
ВКО	ПЦР	≤35	Не детектируется
ОКЭ	ПЦР	Не анализируется	Не детектируется

В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов начиная со стадии экстракции РНК.

В случае несоответствия контрольных точек ОКО и ПКО необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Таблица интерпретации результатов образцов

Результат образца	Значение «Сб» по каналу FAM/Green	Значение «Сб» по каналу HEX/Yellow
Положительный	не анализируется	≤ 33
Сомнительный	не анализируется	33–35
Отрицательный	≤ 35	> 35 или отсутствует
Не валидный	Не детектируется	Не детектируется

Повторный сомнительный результат считается отрицательным и не требует перестановки. Повторный не валидный результат свидетельствует о некачественном отборе клинического материала и требует перепостановки начиная с этапа отбора клинического материала.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «КовидЭк Экстракт» – 12 месяцев с даты изготовления. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение реагентов для амплификации должно осуществляться в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия изготовителя при температуре от -24°C до -16°C в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в морозильных камерах или морозильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от -24°C до -16°C до истечения срока годности. Допускается заморозка/оттаивание компонентов набора реагентов до 10 раз.

Хранение реагентов для выделения РНК должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

После вскрытия неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8°C до истечения срока годности.

Транспортирование: при температуре от 2 до 8°C транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, в течение 30 суток. Допускается транспортирование при температуре окружающей среды, но не выше 37°C в течение 5 суток.

000 «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7 (383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7 (923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7 (843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

