

**И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению****медицинского изделия для диагностики *in vitro*****Набор реагентов «КовидЭк Магнит» 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

ПУ № РЗН 2021/14927 от 30 июля 2021 года.

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «КовидЭк Магнит» 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 Магнит» - ранняя диагностика коронавируса SARS-CoV-2 для предотвращения дальнейшей передачи инфекции.

Набор позволяет проводить очистку коронавирусной РНК как в ручном режиме (на магнитном штативе или с применением центрифуги), так и в автоматическом режиме с использованием любых открытых роботизированных станций (производства Beckman Coulter Inc., Eppendorf International, Thermo Fisher Scientific, Hamilton, Tecan, Aurora Biomed Inc., BioTeke Corporation (Wuxi) Co., Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd (Auto-Pure 96), Yantai Addcare BioTech Co., Ltd. (Nexor 96) и др.

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 связывании нуклеиновых кислот с магнитным сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера.

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 Магнит» состоит из реагентов для выделения вирусной РНК и амплификационной части:

3.1 Таблица 1. Реагенты для выделения РНК

Компонент	Объем
1. Магнитный сорбент	1 пробирка-1,5 мл
2. Сорбирующий раствор	1 флакон-30 мл
3. Промывочный раствор	1 флакон-30 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 **5x10² 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-синцитиальная инфекция, метапневмовирусная инфекция, риновирусная инфекция и коронавирусная инфекция человека (MERS-CoV, HKU1, 229E, OC43, NL63, SARS-CoV), Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae 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 Магнитный штатив (не обязателен, если используется протокол с центрифугированием или автоматизированной станцией);
- 2.5 Автоматизированная станция пробоподготовки (при ее использовании).
- 2.6 Амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени» (например, CFX96, ДТ-96, QuantStudio 5; Rotor Gene Q);
- 2.7 Оптические пробирки для ПЦР-ПВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- 2.8 Мини-центрифуга-вортекс;
- 2.9 Набор дозаторов переменного объема (1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл);
- 2.10 Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема*;
- 2.11 Одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл*;
- 2.12 Штативы для пробирок и наконечников;
- 2.13 Холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- 2.14 Отдельный халат и одноразовые перчатки;
- 2.15 Ёмкость для сброса наконечников;
- 2.16 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.

3.1 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК НА МАГНИТНОМ ШТАТИВЕ

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.

- 3.1.1 В подходящей по объему емкости приготовить смесь, содержащую Сорбирующий раствор и Магнитный сорбент, из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора** и **15 мкл Магнитного сорбента** на проведение одного выделения. Полученную смесь перемешать.
- 3.1.2 В каждую пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести по 315 мкл приготовленной смеси.
- 3.1.3 Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца**.
При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл Элюирующего раствора.
- 3.1.4 Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.
- 3.1.5 Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.
- 3.1.6 Перенести пробирки на магнитный штатив на 30-60 сек. Не затрагивая магнитный сорбент аккуратно удалить надосадочную жидкость.
- 3.1.7 Добавить в каждую пробирку по **300 мкл Промывочного раствора** и перемешать на вортексе.
- 3.1.8 Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.
- 3.1.9 Перенести пробирки на магнитный штатив на 30-60 сек. Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, удалить надосадочную жидкость.

На данном этапе необходимо как можно тщательнее отобрать надосадочную жидкость, так как в дальнейшем остатки Промывочного раствора могут вызвать ингибирование ПЦР.

- 3.1.10 Добавить в каждую пробирку по **100 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе.
- 3.1.11 Инкубировать в течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.
- 3.1.12 Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.
- 3.1.13 Перенести пробирки на магнитный штатив на 30-60 сек. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК, готовую для постановки обратной транскрипции и ПЦР.
- 3.1.14 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.

3.2 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК НА ЦЕНТРИФУГЕ

Установить температуру на термостате 65 °С.

В случае выпадения осадка прогреть Сорбирующий раствор при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

- 3.2.1 В подходящей по объему емкости приготовить смесь, содержащую Сорбирующий раствор и Магнитный сорбент из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора** и **15 мкл Магнитного сорбента** на проведение одного выделения. Полученную смесь перемешать.
- 3.2.2 В каждую пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести по 315 мкл приготовленной смеси.
- 3.2.3 Добавить в каждую пробирку по 100 мкл образца
При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл Элюирующего раствора.
- 3.2.4 Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.
- 3.2.5 Осадить магнитный сорбент в течение 30 сек при 12 000 об/мин, удалить надосадочную жидкость.
- 3.2.6 Добавить в каждую пробирку по **300 мкл Промывочного раствора** и перемешать на вортексе.
- 3.2.7 Осадить магнитный сорбент в течение 30 сек при 12 000 об/мин, удалить надосадочную жидкость.

На данном этапе необходимо как можно тщательнее отобрать надосадочную жидкость, так как в дальнейшем остатки Промывочного раствора 2 могут вызвать ингибирование ПЦР.

- 3.2.8 Добавить в каждую пробирку по **100 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе.
- 3.2.9 Инкубировать в течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1–3 раза) перемешивании.
- 3.2.10 Осадить магнитный сорбент в течение 30 сек при 12 000 об/мин Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК, готовую для постановки обратной транскрипции и ПЦР.
- 3.2.11 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.

3.3 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК НА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СТАНЦИИ

В случае выпадения осадка прогреть Сорбирующий раствор при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

- 3.3.1 В Сорбирующий раствор внести весь объем Магнитного сорбента
- 3.3.2 Разнести по лункам 1-го планшета **Сорбирующий раствор с Магнитным сорбентом по 315 мкл**
- 3.3.3 Разнести по лункам 2-го планшета **Промывочный раствор по 300 мкл.**

- 3.3.4 Разнести по лункам 3-го планшета **Элюирующий раствор по 100 мкл.**
- 3.3.5 В каждую лунку планшета с Сорбирующим раствором и Магнитным сорбентом добавить по **100 мкл образца**
- При необходимости в лунку для ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл ОКЭ (отрицательный контрольный образец, поставляется вместе с тест-системами).
- 3.3.6 Установить все планшеты в прибор.
- 3.3.7 Запрограммировать прибор:
- А) Инкубация образца в Сорбирующем растворе и Магнитном сорбенте течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном перемешивании;
 - Б) Инкубация образца в Промывочном растворе в течение 2 мин при без термостатирования при постоянном перемешивании;
 - В) Инкубация образца в Элюирующем растворе в течение 5 мин при температуре 65 °С при постоянном перемешивании;
 - Г) Собрать магнитный сорбент и сбросить гребенку для магнитных стержней.
- 3.3.8 Запустить программу экстракции.
- 3.3.9 После окончания работы прибора планшет с Элюирующим раствором извлечь. Элюирующий раствор содержит очищенную РНК, готовую для постановки обратной транскрипции и ПЦР.
- 3.3.10 Допускается хранение образцов в течение 4 часов при температуре не выше 4 °С или в течение 1 суток при температуре не выше минус 16 °С.

4. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

4.1 ПОДГОТОВКА ПЦР-СМЕСИ

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

- 4.1.1 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).
- 4.1.2 В пробирке объемом 1,5-2 мл приготовить «Мастер Микс»:
5*(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров
 где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.
- 4.1.3 Перемешать «Мастер Микс» путем 5-кратного переворачивания пробирки, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.
- 4.1.4 В подготовленные пробирки добавить по 10 мкл образца выделенной РНК.
- 4.1.5 Поставить контрольные точки амплификации:
 К- – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ;
 К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКЭ.
 ОКЭ – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ
- 4.1.6 Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

5. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

- 5.1 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	40
Денатурация	95	5 сек	
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» – 5Fl и «MaxReading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

**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).

5.2 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/Коррек. 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 «Ст» по каналу FAM/Green	Значение «Ст» 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 Магнит» – 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 °С до –16 °С 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 °С до –16 °С 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 °С 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 °С до истечения срока годности.

Транспортирование: при температуре от 2 до 8 °С 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 °С 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

