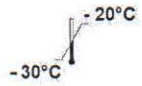
Тест-система для обнаружения РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 в биологических субстратах методом одношаговой ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ)

Инструкция по применению.

	Предназначен для обнаружения фрагментов генома SARS-CoV-2 в биологических субстратах на 50 и 100 исследований	
	Универсальный формат Предназначен для использования с блочными и карусельными термоциклерами, способными работать с пробами объемом 20 мкл и регистрировать FAM/Green и HEX/Yellow флуоресценцию	(50/100 тестов с контролями)
	Рекомендуемая температура хранения	
	ООО «СИВитал» 210017, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. Гагарина, 11в к. 12	тел.: +375-212-23-20-07 факс: +375-212-23-14-48 e-mail: info@sivital.by

ДИРЕКТОР ВЕРНО
АЗОЛИН А. М.



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

Содержимое тест-системы

Таблица 1. Компоненты тест-системы

Маркировка	Объем на 50 иссл.	Объем на 100 иссл.	Вид упаковки	Описание
ПЦР смесь SARS-CoV-2	605 мкл	1155 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой	Смесь, содержащая обратную транскриптазу, Taq-полимеразу, dNTP, ПЦР-буфер и хлорид магния
Олигонуклео-тидный микс SARS-CoV-2	55 мкл	105 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой	Смесь, содержащая специфические праймеры и зонды для SARS-CoV-2 и эндогенного внутреннего контроля
SARS-CoV-2 Положительный контроль	100 мкл	100 мкл	ПЦР-пробирка	Пробирка, содержащая синтетическую РНК SARS-CoV-2
Отрицательный контроль	100 мкл	100 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой	Очищенная вода для ПЦР
	1	1	Инструкция	

Условия хранения, стабильность

Компоненты набора (ПЦР смесь SARS-CoV-2, олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 положительный контроль, отрицательный контроль) должны перевозиться на сухом льду. Их необходимо хранить в темном месте при –20…–30°С, куда следует поместить сразу после доставки. Стабильность набора гарантируется в течение всего срока хранения (при хранении в оговоренных выше условиях).

Сбор образцов

Для обнаружения РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 от пациента возможен забор следующих биологических субстратов:

- мазки со слизистой носоглотки и/или задней стенки ротоглотки (при наличии симптомов поражения дыхательных путей);
- мокрота или бронхоальвеолярный лаваж (в случае интубации трахеи);
- плазма крови;
- фекалии (при наличии симптомов поражения ЖКТ).

Реагенты и оборудование, предоставляемые пользователем

- термоциклер для проведения ОТ-ПЦР РВ;
- компьютер с программным обеспечением для анализа и протоколирования данных;
- пластиковые расходные материалы для термоциклера;
- пипетки, стерильные наконечники для них с аэрозольным барьером;
- микроцентрифуга, пригодная для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для стрипов или 96-луночных планшет;
- твердотельный термостат, пригодный для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл;
- центрифуга-вортекс;
- пробирки 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл;
- одноразовые перчатки без талька, лабораторный халат.

ДИРЕКТОР ВЕРНО
АЗОЛИН А. М.

⚠ Для работы с НК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

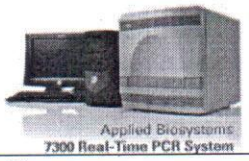
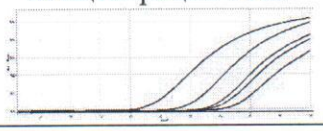
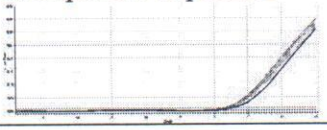
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

⚠ РНК очень чувствительна к деградации эндогенными РНКазами, содержащимися в биологическом образце, а также экзогенными РНКазами, которые постоянно присутствуют в окружающей среде. Для достижения удовлетворительного выхода РНК, загрязнение экзогенными РНКазами должно быть сведено к минимуму, насколько это возможно. Избегайте работы с бактериальными культурами, клеточными культурами или другими биологическими источниками РНКаз в одной и той же лаборатории, где производится очистка РНК.

Принцип действия набора для обнаружения SARS-CoV-2

Набор для обнаружения SARS-CoV-2 (амплификационная часть) – это тест-система, основанная на принципе ОТ-ПЦР РВ. Набор разработан для обнаружения фрагментов генома коронавируса штамма SARS-CoV-2. Положительный контроль определения состоит из синтетической РНК SARS-CoV-2 и должен амплифицироваться вместе с анализируемыми образцами.

Таблица 2. Краткий обзор протокола эксперимента.

1. Выполнить выделение общей РНК с использованием рекомендованного набора для экстракции	Выполнить выделение в соответствии с инструкцией производителя набора для экстракции
2. Приготовить и разлить по пробиркам рабочий раствор реагентной смеси, добавить образцы	Приготовить реагентную смесь из расчета 12 мкл пропорционально числу анализируемых проб. Добавить по 12 мкл полученной смеси во все лунки с испытуемыми образцами и контролями. Добавить по 8 мкл проб РНК в лунки для испытуемых образцов Добавить 8 мкл Положительного контроля SARS-CoV-2 в лунку с положительным контролем, 8 мкл Отрицательного контроля в лунку с отрицательным контролем. Перемешать пипетированием или на вортексе и осадить
3. Закрыть пробирки, установить их в термоциклер, настроить и запустить ОТ-ПЦР РВ	 
4. Анализ кривых роста в испытуемых образцах, контрольных пробах и стандартах определения	Кривые роста концентрации РНК  Кривые роста внутренних контролей образцов 

⚠ **Важно!** Включайте в состав каждой постановки по меньшей мере 1 отрицательный контроль. Отрицательный контроль, в котором произошла амплификация, указывает на контаминацию проб экзогенным генетическим материалом. В этом случае необходимо повторить ОТ-ПЦР РВ, используя свежеприготовленные реагенты.

ДИРЕКТОР
АЗОЛИН А. М.
ВЕРНО

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

⚠ **В целях сохранения полной активности реагентов все операции по дозированию и смешиванию реактивов рекомендуется производить на льду либо на охлаждаемом штативе.**

Этапы работы

1. Разморозьте флаконы, входящие в состав тест-системы, и перемешайте на вортексе в течение 5-10 секунд.
2. Кратковременно центрифугируйте их на центрифуге с максимальной скоростью перед тем, как открыть, чтобы содержимое гарантированно переместилось со стенок пробирок на дно.
3. Рассчитайте необходимое количество проб, учитывая как минимум 1 положительный и 1 отрицательный контроль. Рекомендуется добавлять в расчет 1-2 дополнительные пробы, чтобы компенсировать неточности при дозировании и потери при пипетировании.
4. Приготовьте основную реагентную смесь пропорционально числу анализируемых проб:

Состав реагентной смеси на 1 образец – 12 мкл:

ПЦР смесь SARS-CoV-2	**11 мкл**
Олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2	**1 мкл**

Общий объем реакционной смеси на 1 образец – 20 мкл, включая объем пробы – 8 мкл.

⚠ **При одномоментном использовании всего набора для приготовления реагентной смеси можно полностью перенести олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2 во флакон с ПЦР смесью SARS-CoV-2.**

5. Перемешайте подготовленную смесь пипетированием или на вортексе в течение 3 секунд, затем центрифугируйте в течение 5 секунд на полной скорости.
6. Приготовьте пробирки в количестве, достаточном для амплификации испытуемых образцов, положительного и отрицательного контролей, и поместите их в охлаждаемый штатив.
7. Добавьте 12 мкл рабочего раствора основной реагентной смеси во все пробирки с испытуемыми образцами и контролями.
8. Перенесите 8 мкл Отрицательного контроля в пробирку с отрицательным контролем и 8 мкл Положительного контроля SARS-CoV-2 в лунку с положительным контролем.
9. Добавьте 8 мкл проб РНК в пробирки с испытуемыми образцами.
10. Закройте пробирки с пробами соответствующими крышечками, стрипами крышечек либо оптической пленкой.
11. Встряхните на шейкере, а затем сбросьте жидкость на дно пробирок центрифугированием в течение 10 секунд.
12. Аккуратно поместите подготовленные пробирки в термоциклер, закройте крышку.
13. Запустите настройку протокола ПЦР, следуя рекомендациям производителя, принимая во внимание отличия в настройках своего инструмента.
14. Создайте новый протокол или запустите существующий. Задайте момент считывания данных с планшеты на **этапе отжига/элонгации** при 61 °С. Укажите, что в данном эксперименте нужно использовать каналы FAM/Green (SARS-CoV-2) и HEX/Yellow (эндогенный внутренний контроль). На схеме планшеты укажите используемые ячейки. Впечатайте в каждую ячейку название соответствующей пробы.

ДИРЕКТОР
АЗОЛИН А. М.

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

Таблица 4. Условия амплификации для обнаружения РНК SARS-CoV-2.

Этап	Температура	Время	Число повторов
Обратная транскрипция	44 °С	20 минут	1
Активация полимеразы, инактивирование обратной транскриптазы	95 °С	3 минуты	1
Денатурация	95 °С	10 секунд	10
Отжиг/элонгация	61 °С	50 секунд	
Денатурация	95 °С	10 секунд	30
Отжиг/элонгация и **измерение флуоресценции** по каналам FAM/Green и HEX/Yellow	61 °С	50 секунд	

Приблизительное время, необходимое для завершения ОТ-ПЦР по данному протоколу, составляет 90 минут.

Анализ данных и учет результатов

Результат амплификации НК SARS-CoV-2 регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации внутреннего контроля регистрируется на канале HEX/Yellow. Следует выполнять анализ данных в соответствии с рекомендациями производителя оборудования.

Настройка анализа для амплификаторов Rotor-Gene, Bio-Rad CFX96 и ДТ-96

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

Следует выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – скорректировать параметры анализа по таблице, переместить ее вручную до необходимого уровня. Названия параметров могут отличаться в зависимости от установленной версии программного обеспечения.

Rotor-Gene	
Порог Фона (NTC threshold)	10%
Порог (Threshold)	0,1
Динамический фон	Активно
При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0-30%, а порог может быть изменен в диапазоне 0,02-0,2. Допускается активация функций Динамический фон (Dynamic tube), Коррекция уклона (Slope Correct).	
Bio-Rad CFX96	
Пороговая линия (Baseline threshold)	200
При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25-250. В случае высоких значений уровня сигнала (например, при использовании белых непрозрачных стрипов или планшет) пороговую линию устанавливают на уровне около 10% от максимальной флюоресценции, в точке соответствующей линейной части роста кривой амплификации. Допускается активация функций Применить коррекцию дрифта флюоресценции (Apply Fluorescence Drift Correction) и Коррекция базовой линии (Baseline Subtracted Curve fit).	
ДТ-96	
Метод	Пороговый (Ct)
Пороговая линия	10% от полученных для образцов в последнем цикле амплификации
Порог может быть изменен в диапазоне 0-30%.	

ДИРЕКТОР ВЕРНО
АЗОЛИН А. М.

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

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для внутреннего, положительного и отрицательного контролей амплификации.

Таблица 5. Анализ данных ОТ-ПЦР.

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу FAM/Green менее 30 и значение Ct по каналу HEX/Yellow менее 30	Образец содержит фрагменты генома SARS-CoV-2 (**положительный**)
Значение Ct по каналу FAM/Green менее 20 и отсутствие (N/A) значения Ct по каналу HEX/Yellow	Образец содержит фрагменты генома SARS-CoV-2 (**положительный**)
Отсутствие (N/A) значения Ct по каналу FAM/Green и значение Ct по каналу HEX/Yellow менее 30	Образец не содержит фрагменты генома SARS-CoV-2 (**отрицательный**)
Отсутствие значения Ct по каналу FAM/Green (N/A) и отсутствие значения Ct по каналу HEX/Yellow (N/A)	Результат считается **невалидным**. Необходимо повторить исследование образца, включая этап экстракции

В случае появления сомнительных положительных результатов возможна контаминация инструментов и рабочего места – следует провести деконтаминационные мероприятия в лаборатории.

Решение проблем

Таблица 6. Возможные причины ошибок и способы их устранения.

Проблема	Возможная причина	Решение
Проблемы, связанные с подготовкой образцов		
Недостаточная степень чистоты экстрагированной НК	Контаминация образцов НК солями белков, углеводами и прочей органикой, ингибирующей ПЦР	Избегать методов фенольной и/или других методов экстракции, использовать только прилагаемый набор для экстракции нуклеиновых кислот.
Проблемы, связанные с пипетированием		
Получен флуоресцентный сигнал из проб, не содержащих НК, и/или из контролей контаминации реагентов	Контаминация негативных проб ампликонами	Повторить экстракцию и/или ПЦР с новыми реагентами; провести деконтаминацию инструментов и рабочего места.
Итоговый объем реакционной смеси отличается от 20 мкл	Ошибки пипетирования, например, пропуск либо повторная заливка ячеек	Используйте мультиканальные пипетки, автоматизированное пипетирование либо развивайте внимание и концентрацию.
Проблемы, связанные с амплификацией		
Необычно большие значения C_T стандарта и/или завышенная концентрация НК в	Неверный протокол амплификации	Проверьте настройки оборудования, следуйте инструкциям из руководства по пользованию прибором.
	Нарушение условий и/или сроков хранения реагентов	Проверьте условия хранения и срок годности.

ДИРЕКТОР
АЗОЛИН А. М.

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

испытуемых образцах	Распад определяемой НК	Используйте расходные материалы и реагенты, не содержащие нуклеаз; после синтеза сразу помещайте образцы НК на лед.
Не сигмовидная форма кривых роста стандартов концентрации и испытуемых образцов	Частое размораживание/ оттаивание либо неправильное хранение смеси растворенных реагентов	Прочтите инструкцию, проверьте условия хранения, приготовьте свежую реагентную смесь.
	Условия хранения не соответствуют рекомендуемым, истек срок хранения набора	Проверьте условия хранения и срок годности.
Отсутствует флуоресцентный сигнал	Измерение флуоресцентного сигнала отключено, камера неправильно установлена	Проверьте настройки оборудования.
	Выбран неправильный канал записи флуоресцентного сигнала	Для определения НК возбудителя выберите канал FAM/Green. Для определения внутреннего контроля выберите канал HEX/Yellow.
	Неверный протокол амплификации	Проверьте настройки оборудования.
	Нарушение условий и/или сроков хранения набора	Проверьте условия хранения и срок годности.
Различный вид амплификации НК в испытуемых образцах, непараллельный рост кривых в экспоненциальной фазе реакции	Избыток ингибиторов ПЦР в пробе	Используйте рекомендованный набор для экстракции, точно следуйте инструкциям производителя. Разведение НК перед анализом может снизить содержание ингибиторов в образце
	Загрязнение оптических линз	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера;
Регистрируется низкий уровень флуоресцентного сигнала в ходе амплификации определяемой НК	Загрязнение системы охлаждения и/или матицы оптического сенсора	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера;
	Испарение из ячейки в ходе ПЦР	Крышки планшет, пробирок, стрипов должны быть максимально эффективными.

ДИРЕКТОР
АЗОЛИН А. М.

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