ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru,
www.dna-technology.ru

Набор реагентов
для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV)

№ РЗН 2020/9948 от 01.04.2020

Информация о наборе

REF **R3-P436-S3/9 (стрипы)**
R3-P436-23/9 (пробирки)

Назначение:
Набор реагентов предназначен для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего коронавирусную инфекцию COVID-19, в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Специализированное оборудование:
Амплификаторы детектирующие ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Bio-Rad) или Rotor-Gene Q (QiaGen)

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):
от 2,5 часов.

Количество исследуемых образцов:
96 (включая один положительный и один отрицательный контрольный образец в каждой постановке).

Состав набора:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 810 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов[1]	12 шт.		

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red
Коронавирусы подобные SARS-CoV	ВК*	Коронавирус SARS-CoV-2, ген E	Коронавирус SARS-CoV-2, ген N

* Внутренний контрольный образец РНК-ВК

[1] - входят в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации в стрипы.

2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК, в пробирку, маркированную «К–». Внесите, не повреждая слой парафина, 10 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».

2.10 Центрифугируйте пробирки в течение 3–5 сек на микроцентрифуге-вортексе.

2.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 40 мкл.

При использовании приборов серии ДТ: запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «SARS2,SARS_RNA-IC.lni». При последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 2.11) и проведите ПЦР.

Программа амплификации для приборов Rotor-Gene Q и CFX96 приведена в Таблицах 3, 4.

3 **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицами 5, 6.

Таблица 3 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

№ /Cycling	Температура, °C /Temperature	Время /Hold Time, sec	Количество циклов /Cycle Repeats
Cycling	32 deg	1200	1 time
Cycling 2	95 deg	300	1 time
Cycling 3	94 deg	10	50 times
	60 deg √	15	

√- режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (Fam), Yellow (Hex), Orange (Rox) и Red (Cy5) при 60 °C

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (Bio-Rad)

№ блока (Step)	Температура, °C	Время мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	35	20:00	1
2	95	5:00	1
3	94	0:15	50
4	64 √	0:20	

√- режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam, Hex, Rox, и Cy5 при 64 °C

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения компонентов набора, в течение всего срока годности или в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри контейнера до 25 °C не более 5 суток.

Фермент Taq/RT следует хранить при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности. Пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации, ОТ-ПЦР-буфер, минеральное масло и положительный контрольный образец следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:
ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14,
тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru
Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Выделение РНК

Для выделения РНК из мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата, мокроты используют комплекты для выделения РНК, зарегистрированные в РФ в установленном порядке. Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Таблица 2 - Наборы реагентов, валидированные для выделения РНК коронавируса SARS-CoV-2:

Биоматериал	ПРОБА-НК	ПРОБА-НК (укороченная методика)	ПРОБА-НЧ-НК (фасовка А)	РИБО-преп
мазки из носоглотки, ротоглотки	+	+	+	+
бронхоальвеолярный лаваж	+	-	-	+
эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	+	-	-	+
мокрота	+	-	-	+

В ходе подготовки мазков из носоглотки и зева (ротоглотки), взятых в пробирку с транспортной средой, образцов бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспирата предварительное центрифугирование не требуется.

Для выделения используется **100 мкл образца.**

ВНИМАНИЕ! Объем полученного препарата РНК должен составлять не более 50 мкл.

Внутренний контрольный образец. В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК использовать внутренний контрольный образец (РНК-ВК) из набора реагентов SARS-CoV-2/SARS-CoV.

РНК-ВК следует использовать в объеме **10 мкл на образец.**

Отрицательный контрольный образец. На этапе выделения нуклеиновых кислот обязательно подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы выделения одновременно с выделением РНК из клинических образцов.

В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения нуклеиновых кислот, или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего комплекта реагентов.

2 **Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции**

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации.

2.1 Промаркируйте по одной пробирке со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К–) и положительного контрольного образца (К+).

Например, необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К–» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 8.

2.2 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге/вортексе.
ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT. Смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера,
- 0,5 × (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–» и «К+».
Встряхните пробирку в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

2.4 **ВНИМАНИЕ!** Смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение двух часов после приготовления.

2.5 Добавьте в каждую промаркированную пробирку, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.
ВНИМАНИЕ! При использовании для проведения ПЦР приборов CFX96 и Rotor-Gene Q минеральное масло в пробирки не вносится!

2.6 Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

2.7 Встряхните пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.
ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок/стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, по 10 мкл препарата РНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов. В пробирки «К–», «К+» РНК не вносится.

Таблица 5 - Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Анализируемые образцы				
Cp/Ct/Cq указан	Не учитывается	**Cp/Ct/Cq указан**	**Cp/Ct/Cq указан**	**Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2***
Cp/Ct/Cq указан	Не учитывается	Cp/Ct/Cq не указан	Cp/Ct/Cq не указан	**Обнаружена РНК коронавирусов подобных SARS-CoV** РНК коронавируса SARS-CoV-2 не обнаружена
Cp/Ct/Cq не указан	**Cp/Ct/Cq указан**	Cp/Ct/Cq не указан	Cp/Ct/Cq не указан	РНК коронавирусов подобных SARS-CoV не обнаружена, РНК SARS-CoV-2 не обнаружена
Положительный контрольный образец				
Cp/Ct/Cq указан	Cp/Ct/Cq не указан	**Cp/Ct/Cq указан**	**Cp/Ct/Cq указан**	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец				
Cp/Ct/Cq не указан	**Cp/Ct/Cq указан**	Cp/Ct/Cq не указан	Cp/Ct/Cq не указан	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

*Не исключено одновременное присутствие в образце РНК коронавируса SARS-CoV-2 и др коронавирусов подобных SARS-CoV

Таблица 6 – Другие возможные результаты исследования

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Rox/Orange	Cy5/Red	
Анализируемые образцы				
Cp/Cq ≤ 37 Ct ≤ 35	Не учитывается	**Cp/Ct/Cq указан**	Cp/Ct/Cq не указан	Требуются дополнительные исследов возможна мутация в одном из генов CoV-2
		Cp/Ct/Cq не указан	**Cp/Ct/Cq указан**	
Cp/Ct/Cq не указан или **Cp/Cq ≥ 37 Ct ≥ 35**	Не учитывается	**Cp/Ct/Cq указан**	Не учитывается	Вероятна низкая концентрация РНК CoV-2. Требуется либо повторн выделение препарата нуклеино кислот, либо повторное взяти клинического материала (выполн последовательно)
		Не учитывается	**Cp/Ct/Cq указан**	
Cp/Ct/Cq не указан	Cp/Ct/Cq не указан	Cp/Ct/Cq не указан	Cp/Ct/Cq не указан	Результат недостоверный. Треб перестановка ПЦР, повторное выд РНК для данного образца или пов взятие клинического образ (выполняется последовательн

Символы, используемые при маркировке набора реагенто

IVD	Медицинское изделие для диагностики In vitro	REF	Каталожный номер	LOT	Серия на
	Температурный диапазон		Дата производства		Не стери
	Годен до		Обратитесь к инструкции по применению		Одноразо использ
	Не допускается воздействие солнечного света		Адрес производителя		Количес тестов

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