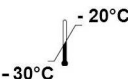


Тест-система для обнаружения РНК коронавируса штамма SARS-CoV-2 в биологических субстратах методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Инструкция по применению.

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

Содержимое тест-системы

Таблица 1. Компоненты тест-системы

Маркировка	Объём	Вид упаковки	Описание
ПЦР смесь SARS-CoV-2	275 мкл	бесцветный флакон, голубая крышка	Смесь, содержащая Taq-полимеразу, dNTP, ПЦР-буфер и хлорид магния
Олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2	55 мкл	янтарный флакон, янтарная крышка	Смесь, содержащая специфические праймеры и зонды для SARS-CoV-2 и эндогенного внутреннего контроля
Обратная транскриптаза	44 мкл	бесцветный флакон, бесцветная крышка	Смесь, содержащая фермент обратную транскриптазу
SARS-CoV-2 Положительный контроль	100 мкл	ПЦР-пробирка	Пробирка, содержащая синтетическую РНК SARS-CoV-2
Вода для ПЦР	1500 мкл	бесцветный флакон, бесцветная крышка	Очищенная вода для ПЦР
	1	Инструкция	

Условия хранения, стабильность

Комплект для выделения нуклеиновых кислот (НК) должен транспортироваться и храниться при температуре +2...+8°C. Остальные компоненты набора (ПЦР смесь SARS-CoV-2, олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2, обратная транскриптаза, SARS-CoV-2 положительный контроль, вода для ПЦР) должны перевозиться на сухом льду. Их необходимо хранить в темном месте при – 20...– 30°C, 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;
- компьютер с предустановленным программным обеспечением термоциклера 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.

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

Выделение РНК из биологического материала

Осуществляют с помощью комплекта для выделения нуклеиновых кислот, входящего в состав тест-системы.

Амплификационная часть тест-системы позволяет проводить ОТ-ПЦР и при иных способах выделения НК. В случае выделения НК способом, отличным от предлагаемого тест-системой, следует придерживаться рекомендаций производителя.

Таблица 2. Состав комплекта для выделения РНК SARS-CoV-2 из биологических субстратов.

Компонент	Объём
Лизирующий раствор	25 мл
Буфер РП	20 мл
Промывочный раствор №1	25 мл
Промывочный раствор №2	15 мл
Буфер РС	15 мл

⚠ В лизирующем растворе допускается выпадение осадка. Перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65 °С в течение 10 минут.

Алгоритм выделения НК:

1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца по одной пробирке.
 2. Внесите в каждую пробирку 500 мкл **лизирующего раствора**, не касаясь ее края.
 3. Внесите по 200 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов.
 4. Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 минут, центрифугируйте при 16000g в течение 30 секунд.
 5. Добавьте 400 мкл **буфера РП** и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 секунд.
 6. Центрифугируйте пробирки при 16000g в течение 15 минут.
 7. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
 8. Добавьте к осадку 500 мкл **промывочного раствора №1**, закройте крышки пробирок и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки.
 9. Центрифугируйте пробирки при 16000g в течение 5 минут.
 10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
 11. Добавьте к осадку 300 мкл **промывочного раствора №2**, закройте крышки пробирок и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки.
 12. Центрифугируйте пробирки при 16000g в течение 5 минут.
 13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
 14. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 минут.
 15. Добавьте к осадку 150 мкл **буфера РС**, закройте крышки пробирок.
 16. Осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 секунд.
 17. Прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 минут. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 секунд.
 18. Центрифугируйте пробирки при 16000 g в течение 30 секунд.
- Препарат НК готов для постановки ОТ-ПЦР.

Хранение РНК

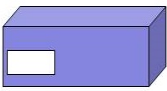
Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки ОТ-ПЦР. Допускается хранение до 1 года при температуре минус 80 °С.

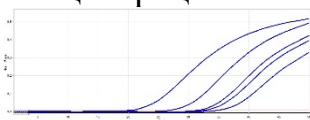
⚠ РНК очень чувствительна к деградации эндогенными РНКазами, содержащимися в биологическом образце, а также экзогенными РНКазами, которые постоянно присутствуют в окружающей среде. Для достижения удовлетворительного выхода РНК, загрязнение экзогенными РНКазами должно быть сведено к минимуму, насколько 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. 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 3. 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. См. таблицу 4. 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 в лунку с положительным контролем, 8 мкл воды для ПЦР в лунку с отрицательным контролем.  Перемешать на вортексе и центрифугировать 5 секунд 1500g

3. Закрыть пробирки, установить их в термоциклер, настроить и запустить ОТ-ПЦР		
4. Анализ кривых роста в испытуемых образцах, контрольных пробах и стандартах определения	Кривые роста концентрации РНК 	Кривые роста внутренних контролей образцов 

Универсальный протокол для устройств, поддерживающих детекцию FAM/HEX флуоресценции



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



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

Этап работы
1. Разморозьте флаконы входящие в состав тест-системы и перемешайте на вортексе 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. Приготовление основной реагентной смеси (Таблица 4). • Перемешайте подготовленную смесь пипетированием или на вортексе в течение 3 секунд, затем центрифугируйте в течение 5 секунд на полной скорости. • Рекомендуется добавлять в расчет 1-2 дополнительные пробы, чтобы компенсировать неточности при дозировании и потери при пипетировании.

Таблица 4. Перечень и объемы (мкл) реагентов для приготовления рабочего раствора основной реагентной смеси.

Число образцов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ПЦР Смесь SARS-CoV-2	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Обратная транскриптаза	0,8	1,6	2,4	3,2	4	4,8	5,6	6,4	7,2	8	8,8	9,6	10,4	11,2
Вода для ПЦР	5,2	10,4	15,6	20,8	26	31,2	36,4	41,6	46,8	52	57,2	62,4	67,6	72,8
Число образцов	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
ПЦР Смесь SARS-CoV-2	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140
Обратная транскриптаза	12	12,8	13,6	14,4	15,2	16	16,8	17,6	18,4	19,2	20	20,8	21,6	22,4
Вода для ПЦР	78	83,2	88,4	93,6	98,8	104	109,2	114,4	119,6	124,8	130	135,2	140,4	145,6
Число образцов	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
ПЦР Смесь SARS-CoV-2	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210
Обратная транскриптаза	23,2	24	24,8	25,6	26,4	27,2	28	28,8	29,6	30,4	31,2	32	32,8	33,6
Вода для ПЦР	150,8	156	161,2	166,4	171,6	176,8	182	187,2	192,4	197,6	202,8	208	213,2	218,4
Число образцов	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	
Олигонуклеотидный микс SARS-CoV-2	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	
ПЦР Смесь SARS-CoV-2	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	
Обратная транскриптаза	34,4	35,2	36	36,8	37,6	38,4	39,2	40	40,8	41,6	42,4	43,2	44	
Вода для ПЦР	223,6	228,8	234	239,2	244,4	249,6	254,8	260	265,2	270,4	275,6	280,8	286	

4. Приготовьте пробирки в количестве, достаточном для амплификации испытуемых образцов, положительных (SARS-CoV-2 Положительный контроль) и отрицательного контролей, и поместите их в охлаждаемый штатив.

5. Добавьте 12 мкл рабочего раствора основной реагентной смеси (см. табл. 4) во все пробирки с испытуемыми образцами и контролями.

6. Перенесите 8 мкл воды для ПЦР в пробирку с отрицательным контролем, не содержащей образцов, и 8 мкл SARS-CoV-2 Положительного контроля в лунку с положительным контролем.

7. Добавьте 8 мкл проб РНК в пробирки с испытуемыми образцами.

8. Закройте пробирки с пробами соответствующими крышечками, стрипами крышечек либо оптической пленкой.

9. Встряхните на шейкере, а затем сбросьте жидкость на дно пробирок центрифугированием в течение 10 секунд.

10. Аккуратно поместите подготовленные пробирки в термоциклер, закройте крышку.

11. Запустите настройку протокола ПЦР следуя рекомендациям производителя, принимая во внимание отличия в настройках своего инструмента.

Создайте новый протокол или запустите существующий. Задайте момент считывания данных с планшеты на **этапе отжига/элонгации** при 59 °С. Укажите, что в данном эксперименте нужно использовать каналы FAM (SARS-CoV-2) и HEX (эндогенный внутренний контроль). На схеме планшеты укажите используемые ячейки. Впечатайте в каждую ячейку название соответствующей пробы.

Таблица 5. Условия амплификации для обнаружения РНК SARS-CoV-2.

Этап	Температура	Время	Число повторов
Обратная транскрипция	50 °С	20 минут	1
Активация полимеразы, инактивирование ревертазы	95 °С	3 минуты	1
Денатурация	95 °С	15 секунд	5
Отжиг	59 °С	20 секунд	
Элонгация	72 °С	10 секунд	
Денатурация	95 °С	15 секунд	40
Отжиг и измерение флуоресценции	59 °С	20 секунд	
Элонгация	72 °С	10 секунд	

Общее время, необходимое для завершения ОТ-ПЦР по данному протоколу – приблизительно 1 час 30 минут.

Анализ данных

Каждый цикл амплификации РНК приводит к генерации флуоресцентного сигнала, измеряемого в FAM канале для мишени, что приводит к формированию сигмовидной кривой роста. Следует выполнять анализ данных в соответствии с рекомендациями производителя оборудования с использованием совместимого программного обеспечения.

1. При значении СТ по каналу FAM менее 40, и значении СТ по каналу HEX менее 40 образец содержит фрагменты генома SARS-COV-2 (положительный).

2. При отсутствии (N/A) значения СТ по каналу FAM и значении СТ по каналу HEX менее 40 образец не содержит фрагменты генома SARS-COV-2 (отрицательный).

3. При значении СТ по каналу FAM менее или равный 20, и отсутствии значения СТ по каналу HEX (N/A) образец содержит фрагменты генома SARS-COV-2 (положительный).

4. При значении СТ по каналу FAM более 20, и отсутствии значения СТ по каналу HEX (N/A) необходимо повторить исследование образца, в том числе в

двух десятикратных разведениях. Если при этом в одной из проб обнаружатся сигмоидные кривые по каналу FAM и HEX – образец содержит фрагменты генома SARS-COV-2 (положительный).

5. При отсутствии значения СТ по каналу FAM (N/A), и отсутствии значения СТ по каналу HEX (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.

 Установленный пороговый уровень детекции может существенно повлиять на значения СТ. Устанавливайте величины пороговых уровней в соответствии с рекомендациями производителя амплификатора.

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 испытуемых образцах	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.
	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 рекомендуем, 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. Для определения внутреннего контроля выберите канал HEX.
	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; если позволяет конструкция – раз в месяц протирать линзы, используя абсолютный этиловый спирт и ватные палочки.
Регистрируется низкий уровень флуоресцентного сигнала в ходе амплификации определяемой НК	Загрязнение системы охлаждения и/или матрицы оптического сенсора	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера; можно также заполнить каждую ячейку сенсора изопропанолом, инкубировать 10 минут при 50°C, удалить изопропанол и промыть бидистиллированной водой.
	Испарение из ячейки в ходе ПЦР	Крышки планшет, пробирок, стрипов должны быть максимально эффективными.