



## Інструкція з використання



Набір діагностичний «Biocore® SARS-CoV-2» для виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 методом ЗТ-ПЛР у реальному часі (300 реакцій).

Для *in vitro* діагностики.

### Призначення:

Набір діагностичний «Biocore® SARS-CoV-2» (у подальшому Набір) призначений для виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, Коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому-2), що викликає гостру респіраторну хворобу COVID-19 (Coronavirus disease 2019) у людини, методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ, rRT-PCR).

**Цільова група:** пацієнти з симптомами ГРВІ, особи, які перебували в контакті з хворими на COVID-19, медичні працівники та інші особи, що перебувають у епідеміологічній зоні.

**Застосування:** Набір застосовується у клінічних діагностичних лабораторіях, а також в інших установах, які працюють в області *in vitro* діагностики.

**Увага!** Для використання Набору лабораторія має бути оснащеною відповідним обладнанням та витратними матеріалами для проведення ПЛР у реальному часі і відповідати вимогам Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

### Загальна інформація:

Набір «Biocore® SARS-CoV-2» має однопробірковий одностадійний формат, без окремого етапу синтезу кДНК на матриці вірусної РНК. Етап зворотної транскрипції (ЗТ) відбувається в реакційній суміші безпосередньо перед стартом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проведення аналізу ґрунтується на *TaqMan*-технології методу ПЛР-РЧ. Для запобігання виникнення хибно-позитивних результатів внаслідок перехресної контамінації, а також контролю виділення РНК і проходження ЗТ-ПЛР-РЧ реакції, в Наборі використовуються урацил-ДНК-глікозилаза (УДГ, UDG) та внутрішній ендегенний контроль (БК - ген *RNase P* людини).

### Аналітичні характеристики:

Валідацію Набору «Biocore® SARS-CoV-2» проводили шляхом використання контрольного матеріалу: EURM-019 ssRNA fragments of SARS-CoV-2 (JRC, EU), AcroMatrix™ COVID-19 RNA control (Thermo Fisher Scientific, USA), SARS-CoV-2 positive control: plasmid DNA (Synbio Technologies, USA).

Специфічність Набору оцінювали як здатність на 100% диференціювати РНК вірусу SARS-CoV-2 від РНК/ДНК інших інфекційних агентів вірусного та бактеріального походження. Встановлено відсутність хибно-позитивних та хибно-негативних результатів, а також неспецифічних реакцій зі сторонніми організмами.

Межа детектування (limit of detection, LOD) набору становить близько 10 копій на реакцію, аналітична чутливість складає  $2 \times 10^3$  ГЕ/мл.

### Склад:

Набір «Biocore® SARS-CoV-2» розрахований на 300 реакцій об'ємом 20 мкл. До складу Набору входять такі компоненти:

ПЛР-РЧ суміш (4х)	– 3 пробірки 0,5 мл
Суміш праймерів та зондів	– 3 пробірки 1 мл
НКЗ (негативний контрольний зразок)	– 1 пробірка 0,15 мл
ПКЗ (позитивний контрольний зразок)	– 1 пробірка 0,15 мл

Всі компоненти Набору, за виключенням **ПКЗ**, зберігаються при температурі від **мінус 18°C** до **мінус 24°C**. Після першого розморожування **ПКЗ** зберігається при температурі від **плюс 4°C** до **плюс 8°C**.

### Етапи проведення аналізу:

#### 1. Екстракція РНК з досліджуваного матеріалу

Біологічним матеріалом для екстракції РНК слугують зразки з верхніх дихальних шляхів (мазки із зіву, мазки з носа, носоглоткові секрети), зразки з нижніх дихальних шляхів (мокротиння, секрети дихальних шляхів, рідина бронхоальвеолярного лаважа), кров, сеча, фекалії та кон'юнктивальний секрет людини. Рекомендації щодо відбору, зберігання та транспортування зразків матеріалів для тестування на SARS-CoV-2 описані в Стандартах медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», затверджених Наказом МОЗ України від 28.03.2020 № 722.

**Увага!** При підготовці зразків для дослідження необхідно дотримуватись стандартних заходів безпеки з метою мінімізації можливості інфікування та забруднення навколишнього середовища, керуючись при цьому діючими Стандартами медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», Державними санітарними нормами і правилами, а також тимчасовими рекомендаціями ВООЗ «Лабораторні вказівки щодо біобезпеки, пов'язані з коронавірусною хворобою (COVID-19)» («Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19)», [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331500/WHO-WPE-GI\\_H-2020.2-en.g.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331500/WHO-WPE-GI_H-2020.2-en.g.pdf))

Екстракцію РНК з біологічного матеріалу проводять за допомогою будь-якого комерційного набору, призначеного для виділення РНК згідно інструкції виробника.

Нижче наведено перелік рекомендованих наборів:

Тип зразку	Назва набору	Виробник та Кат. №
Мазки, секрети, мокротиння	Набір реагентів Biocore® Nucleo-M MagMAX™ Viral/Pathogen II NA Isolation Kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit	ТОВ Біокор Текнолоджі ЛТД CM-NA203-100/500/1000 Applied Biosystems™ A48383 Invitrogen™ 12183555
Кров, сеча	MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit	Applied Biosystems™ A27828
Фекалії	RNeasy Power Microbiome Kit	Qiagen, 26000-50

За необхідності вихід та чистоту екстрагованої РНК можна перевірити методом спектрофотометрії шляхом визначення співвідношення довжин хвиль  $A_{260/280}$ , яке має вкладатися у діапазон 1,8-2,0.

Для валідації Набору використовували комерційний набір TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen™, Кат. № 12183555).

**Увага!** Допускається зберігання виділених зразків РНК протягом одного тижня при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  та більш тривале зберігання при температурі  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Проведення процедури ЗТ-ПЛР-РЧ

Попередньо слід розморозити всі компоненти Набору, ретельно перемішати та осадити краплини короткочасним центрифугуванням.

**Увага!** Уникати потрапляння прямих сонячних променів на компоненти Набору. Розморозжені компоненти тримати при кімнатній температурі лише протягом часу, необхідного для приготування реакційної суміші.

Реакційну суміш готувати із розрахунку **5 мкл** ПЛР-РЧ суміші (4x) і **10 мкл** суміші праймерів та зондів на один зразок. Суміш ретельно перемішати на вортексі, краплини осадити короткочасним центрифугуванням. Використовуючи одноразові наконечники з аерозольним бар'єром, у відібрані ПЛР пробірки (стриповані пробірки, лунки планшету), враховуючи пробірки під НКЗ і ПКЗ, рознести по **15 мкл** реакційної суміші. Після цього внести по **5 мкл** РНК досліджуваних зразків, а в пробірки контролю ПЛР по **5 мкл** контрольних зразків.

**Увага!** Згідно вимог до методу ПЛР у реальному часі рекомендовано кожен досліджуваний зразок аналізувати у двох повтореннях з етапу екстракції НК.

Набір було валідовано для роботи з лінійкою приладів - ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems), Rotor-Gene Q (Qiagen), CFX96™ (Bio-Rad).

Прилад для проведення ПЛР-РЧ програмується згідно з інструкцією виробника, під час програмування враховуються наступні параметри:

- об'єм реакційної суміші **20 мкл**;
- функція пасивного референтного барвника ROX™ для приладів лінійки Applied Biosystems відключена;
- детектори флуоресценції обрані згідно таблиці 1;

Таблиця 1

Назва мішені	Канали флуоресценції
ген <i>ORF1ab</i> SARS-CoV-2	FAM / Green
ген <i>N</i> SARS-CoV-2	VIC / Yellow
БК (внутрішній контроль)	JUN / ROX / Orange

- температурний профіль режиму ампліфікації згідно таблиці 2;

Таблиця 2

Етапи	Збір даних	Цикли	Т	Час
1	-	1	25°C	2 хв
2	-	1	53°C	10 хв
3	-	1	95°C	2 хв
4	-	40	95°C	5 сек
5	✓*		60°C	30 сек

\*Рівень флуоресценції за всіма каналами вимірюється на етапі 5.

## 3. Облік та інтерпретація результатів аналізу

Облік результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу проводиться за наявності або відсутності графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає. За каналом FAM/Green реєструються дані, що відповідають гену *ORF1ab*, за каналом VIC/Yellow – гену *N* SARS-CoV-2, а за каналом JUN/ROX/Orange – БК.

Обробка отриманих даних здійснюється згідно інструкції до приладу. Прилад автоматично розраховує порогову (*threshold line*) та базову (*baseline*) лінії. За необхідності їх можна виставити у ручному режимі, окремо для кожного каналу. Порогова лінія встановлюється над рівнем «фонові флуоресценції», приблизно посередині логарифмічної фази графіків ампліфікації. Кінець базової лінії задається за 5 циклів до перетину графіком ампліфікації порогової лінії, а початок – за 12 циклів від кінця базової лінії.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо контрольні зразки відповідають критеріям, наведеним у таблиці 3:

Таблиця 3

Зразки	SARS-CoV-2		БК Jun/Orange
	ORF1ab Fam/Green	N Vic/Yellow	
НКЗ	Ct ≥ 37	Ct ≥ 37	Ct ≥ 37
ПКЗ	Ct < 35	Ct < 35	Ct < 35

Якщо значення негативного та позитивного контрольних зразків не відповідають зазначеним вимогам, то аналіз вважається некоректним і потребує повторного проведення.

Інтерпретація результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу щодо виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 проводиться згідно таблиці 4:

Таблиця 4

SARS-CoV-2 мішень*		БК Jun/Orange	Результат
ORF1ab Fam/Green	N Vic/Yellow		
Ct < 37		Ct < 35	Вірус виявлено
Ct ≥ 37		Ct < 35	Вірус відсутній
Ct ≥ 37		Ct ≥ 35	Сумнівний результат

\*[https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1246\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1246_article)

Зразок вважається позитивним на SARS-CoV-2 при наявності позитивного сигналу за будь-яким з генів (ORF1ab, N). У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно, починаючи з етапу екстракції РНК.

## 4. Додаткова інформація

Виробник гарантує придатність Набору протягом **12 місяців** з дати виготовлення при дотриманні умов зберігання, транспортування та використання. Умови зберігання: компоненти набору зберігаються при температурі від **мінус 24°C** до **мінус 18°C**, за виключенням **ПКЗ**, який зберігається при температурі від **плюс 4°C** до **плюс 8°C** після першого розморожування. Під час транспортування Набору дозволяється одноразове короткочасне зберігання (протягом 1-2 діб) при температурі від **плюс 2°C** до **плюс 4°C**.

Відгуки, пропозиції та рекламації щодо якості Набору направляти:

Юридична адреса: вул. Петра Болбочана, 4-А, м. Київ, Україна, 01133;

Адреса виробництва: Харківське шосе, 48, м. Київ, Україна, 02160; тел.: +38 (044) 490-47-00,

e-mail: [info@biocor-tech.com](mailto:info@biocor-tech.com), [www.biocor-tech.com](http://www.biocor-tech.com)

Графічний символ	Значення
	Ознайомитися із супровідними документами
	Температурне обмеження
	Ознайомитися з інструкцією по застосуванню
	Знак відповідності технічним регламентам
	Для діагностики in vitro
	Код партії
	Термін придатності
	Дата виробництва