



## Інструкція з використання



Набір діагностичний «Bioscore® SARS-CoV-2 Mutation Panel v.2» для виявлення мутацій (L452R, T452R, E484Q), які характерні для лінії покоління B.1.617 SARS-CoV-2, методом ЗТ-ПЛР у реальному часі (100 реакцій). Для *in vitro* діагностики.

### Призначення:

Набір діагностичний «Bioscore® SARS-CoV-2 Mutation Panel v.2» (у подальшому Набір) призначений для виявлення мутацій у гені, що кодує спайковий білок (S-білок) коронавірусу SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, Коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому-2), які характерні для лінії покоління B.1.617 (B.1.617.1\_Kappa, B.1.617.2\_Delta, B.1.617.2.1\_Delta Plus, B.1.617.3), методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ, rRT-PCR).

**Цільова група:** пацієнти у яких було виявлено коронавірус SARS-CoV-2, особи з ознаками ГРВІ або такі, що контактували з хворими на COVID-19.

**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 «Bioscore® SARS-CoV-2 Mutation Panel v.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 «Bioscore® SARS-CoV-2 Mutation Panel v.2» проводили шляхом використання контрольного матеріалу: AcroMetrix™ COVID-19 RNA control (Thermo Fisher Scientific, USA), рекомбінантні плазмідні ДНК з клонуваними фрагментами гену *S* SARS-CoV-2 (GenScript, Germany).

Специфічність Набору оцінювали як здатність на 100% диференціювати точкові мутації L452R, T452R, E484Q в референтній послідовності гену *S* SARS-CoV-2 (hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019) та послідовності SARS-CoV-2 лінії покоління B.1.617. 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 «Bioscore® SARS-CoV-2 Mutation Panel v.2» розрахований на 100 реакцій об'ємом 20 мкл. До складу Набору входять такі компоненти:

ПЛР-РЧ суміш (4х)	– 1 пробірка 1,5 мл;
Суміш (L452R, T452R, E484Q)	– 3 пробірки 1,0 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>).

Екстракцію РНК з біологічного матеріалу проводять за допомогою будь-якого комерційного набору, призначеного для виділення РНК згідно інструкції виробника. Для валідації Набору використовували комерційні набори: TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen™, Кат. № 12183555), Набір реагентів Bioscore® Nucleo-M (ТОВ Біокор Текнолоджі ЛТД, Кат. № CM-NA203-100/500/1000).

**Увага!** Допускається зберігання виділених зразків РНК протягом одного тижня при температурі -20°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. Розморожені компоненти тримати при кімнатній температурі лише протягом часу, необхідного для приготування реакційної суміші.

Для визначення кожної з трьох мутацій необхідно приготувати окремі реакційні суміші. Реакційну суміш готувати із розрахунку **5 мкл** ПЛР-РЧ суміші (4х) і **10 мкл** суміші (L452R, T452R, E484Q) на один зразок. Реакційну суміш ретельно перемішати на вортексі,

краплини осадити короточасним 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 рекомендацій щодо методу ПЛР у реальному часі бажано кожен досліджуваний зразок аналізувати у двох повтореннях.

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
Послідовність лінії покоління В.1.617	FAM / Green
Референтна послідовність	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	60°C	30 сек
2	-	1	50°C	10 хв
3	-	1	95°C	2 хв
4	-	45	95°C	5 сек
5	✓*		60°C	30 сек
6	-	1	60°C	30 сек

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

### 3. Облік та інтерпретація результатів аналізу

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.

Облік та інтерпретація результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу проводиться на підставі оцінки співвідношення графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає, отриманих для каналів детекції FAM і VIC. Додатково можна скористатися опціями програмного забезпечення приладів обравши: тип дослідження Genotyping (Генотипування) для приладів лінійки Applied Biosystems або закладку Allelic Discrimination (Дискримінація алелей) для CFX96™ (Bio-Rad).

За каналом FAM/Green реєструються дані, що відповідають мутації характерним для лінії покоління В.1.617, за каналом VIC/Yellow – референтній послідовності SARS-CoV-2 (hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019), а за каналом JUN/ROX/Orange – БК.

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

Таблиця 3

Зразки	SARS-CoV-2 мішень		БК
	Fam/Green	Vic/Yellow	Jun/Orange
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 мутацій (L452R, T452R, E484Q), які характерні для лінії покоління В.1.617 коронавірусу SARS-CoV-2, проводиться згідно таблиць 3, 4:

Таблиця 3

Назва лінії	Назва мутації		
В.1.617	L452R	-	E484Q
В.1.617.1_Kappa	L452R	-	E484Q
В.1.617.2_Delta	L452R	T452R	-
В.1.617.2.1_Delta Plus	L452R	T452R	-
В.1.617.3	L452R	-	E484Q

Таблиця 4

SARS-CoV-2 мішень		БК Jun/Rox/Orange	Результат
Fam/Green	Vic/Yellow		
> / +	< / -	Ct < 35	Мутацію виявлено
< / -	> / +	Ct < 35	Мутація відсутня
-	-	Ct ≥ 35	Сумнівний результат

Ознаками мутації, характерної для лінії покоління В.1.617 є наявність більш інтенсивного графіка ампліфікації за показниками Ct / ΔRn(RFU) за каналом Fam/Green порівняно з каналом Vic/Yellow або наявність графіка ампліфікації лише за каналом Fam/Green. Відповідно, наявність більш інтенсивного графіка ампліфікації за каналом Vic/Yellow порівняно з каналом Fam/Green або наявність графіка ампліфікації лише за каналом Vic/Yellow засвідчує про відсутність даної мутації. У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно.

### 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 короточасне зберігання (протягом 1-2 діб) при температурі від **плюс 2°C** до **плюс 4°C**.

Відгуки, пропозиції та рекламачії 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