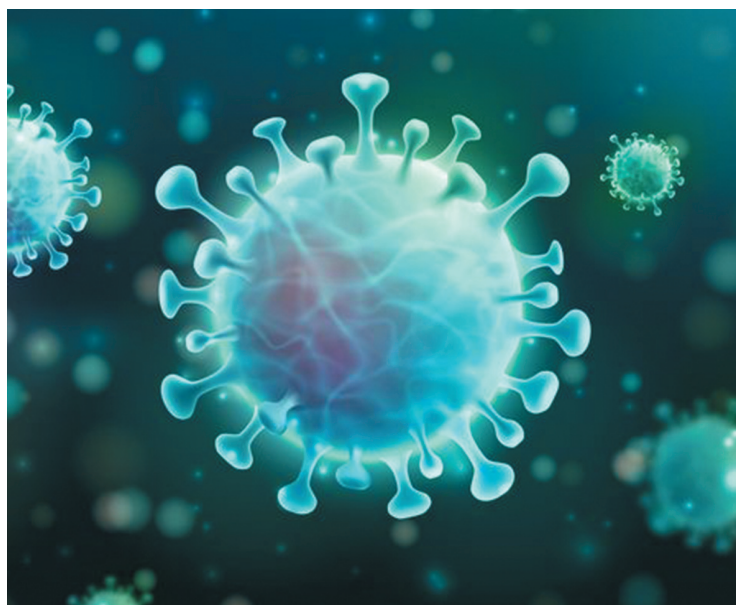


SARS-CoV-2/ SARS-CoV

SARS-CoV-2/SARS-CoV

Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
РЗН № 2020/9948

Коронавирусы (Coronaviridae) – семейство РНК-содержащих вирусов, ассоциированных с поражениями верхних дыхательных путей.



Симптомы вирусной инфекции варьируют от легкого кашля до острой пневмонии. Осложненное течение с развитием сердечной, почечной, печеночной, сосудистой недостаточностью возможно у пациентов с хроническими заболеваниями. Большинство видов коронавирусов вызывают круглогодичные ОРВИ, как правило, без тяжелого течения и осложнений. Исключение составляют два представителя рода *Betacoronavirus*: SARS-CoV и MERS-CoV), которые являются возбудителями тяжелой атипичной пневмонии и отнесены ко II группе патогенности. К этой же группе отнесен и новый вид коронавируса – **SARS-CoV-2 (COVID-19)**.

11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку новой коронавирусной инфекции COVID-19 пандемией (рис. 1).

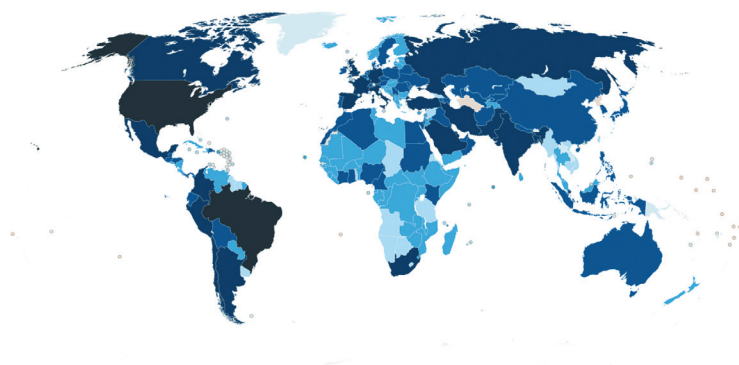


Рис. 1. Схема распространения коронавируса COVID-19 в мире
(<https://multimedia.scmp.com/infographics/news/china/article/3047038/wuhan-virus/index.html?src=article-launcher>)

Постановлением Правительства РФ от 31.01.2020 г. № 66 «О внесении изменения в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих» новая коронавирусная инфекция (COVID-19, код МКБ-10 – В 34.2 «Коронавирусная инфекция неуточненная») добавлена в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих, наряду с ООИ (чума, холера, оспа), утвержденных ранее Постановлением Правительства РФ от 01.12.2004 г. № 715.

Согласно Временным методическим рекомендациям МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», Методическим рекомендациям МЗ РФ «Организация оказания медицинской помощи беременным, роженицам, родильницам и новорожденным при новой коронавирусной инфекции COVID-19» и Методическим рекомендациям МЗ РФ «Особенности клинических проявлений и лечения заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) у детей» лабораторная диагностика коронавирусной инфекции основывается на выявлении РНК SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Всемирная организации здравоохранения (ВОЗ) для подтверждения случаев COVID-19 рекомендует использовать метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией вирусной РНК. В качестве целевых мишеней рекомендуется использовать несколько генов: нуклеокапсида (N), мелкой мембраны (E), «протеиновых шипов» (S) и специфической РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) (*Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. WHO*).

Поскольку нельзя исключить возникновение новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2, для повышения надежности диагностики в качестве мишеней предлагается использовать 2-3 участка генома вируса. Большинство международных и локальных организаций здравоохранения рекомендует использовать в качестве мишени ген нуклеокапсида (N) и один из дополнительных генов (таблица 1).

Таблица 1. Перечень рекомендуемых* к определению генов-мишеней SARS-CoV-2

Страна	Организация	Рекомендуемые к определению гены-мишени
Китай	China CDC	N (nucleocapsid phosphoprotein), ORF1ab
Германия	Charité	N, E (envelope protein), RdRP (ORF1ab)
Гонконг	Гонконгский университет (HKU)	N, ORF1b-nsp14
Япония	National Institute of Infectious Diseases	S (surface glycoprotein), ORF1a, ORF10
Тайланд	National Institute of Health	N
США	US CDC, Atlanta	N (три варианта набора олигонуклеотидов для выявления последовательности гена N)

* <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

Выявление РНК SARS-CoV-2 с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот имеет основное значение для лабораторной диагностики COVID-19, обнаружение иммуноглобулинов класса G (IgG) играет вспомогательную роль. Исследования постинфекционного иммунитета показали, что у большинства пациентов с COVID-19 IgG выявляются через 10-12 дней после первых признаков заболевания. Однако иммуноферментный анализ и другие методы, которые позволяют обнаруживать IgG к SARS-CoV-2, имеют принципиально значение только для установления факта перенесенной ранее инфекции.

Для лабораторной диагностики коронавирусной инфекции COVID-19 рекомендуется использовать биоматериал, полученный из респираторного тракта: мазки из носо- и ротоглотки, мокроту, материал из легких, полученный при инструментальных манипуляциях (аспират, лаваж).

Рекомендованными видами биоматериала для женщин при беременности и в послеродовом периоде являются: мазок из зева, вагинальные, ректальные, плацентарные мазки; материнская и пуповинная кровь; грудное молоко.

С целью проведения первичной специфической диагностики COVID-19 у детей на исследование необходимо направлять назофарингеальный и орофарингеальный мазок (диагностическая ценность последнего ниже), а также мокроту, бронхо-альвеолярный лаваж, образцы крови и кала заболевших детей.



Для установления статуса COVID-статуса у новорожденных рекомендуется исследовать мазки из зева/ ротоглотки (все новорожденные), а также аспират из трахеобронхиального дерева, кровь и стул (по показаниям).

В соответствии с документами ВОЗ и МЗ РФ компания «ДНК-Технология» разработала 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).

Данный набор входит в Перечень зарегистрированных в РФ диагностических наборов реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 (Временные методические рекомендации МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Качество набора подтверждено международным сертификатом QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания. Входит в Перечень диагностических наборов реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 Европейской комиссии.

Конкурентные преимущества набора:



1) результат диагностики соответствует требованиям ВОЗ:

- высокая специфичность в результате тестирования трех мишеней вирусных генов;
- высокая чувствительность в результате гарантированного «горячего» старта;
- контроль адекватности клинического материала;
- возможность тестирования всех рекомендованных видов биоматериала.



2) решение «под ключ» от одного производителя:

- транспортная среда «СТОП-Ф»;
- пробоподготовка — набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот «ПРОБА-НК-S», «ПРОБА-НК»;



- набор реагентов для выявления вируса;
- оборудование и программное обеспечение – приборы ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96.

3) технологические преимущества:

- обратная транскрипция и ОТ-ПЦР «в одной пробирке»;
- мультиплексный анализ;
- снижение риска контаминации ампликонами – расфасовка под парафин;

- время проведения исследования – от 2 ч.*

В соответствии с требованиями системы менеджмента качества (ISO 13485:2016, ISO 9001:2015), с целью **минимизации рисков получения ложноотрицательных результатов** по причине возникновения новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2 и для **повышения надежности диагностики**, реализованы следующие решения:

• **В качестве мишеней выбраны три участка генома коронавируса:**

- специфичные для SARS-CoV-2 участки гена N и гена E;
- консервативный участок гена E, общий для группы коронавирусов подобных SARS-CoV (включая SARS-CoV и SARS-CoV-2). Данное решение не имеет российских аналогов и дополнительно позволяет выявлять возбудителя атипичной пневмонии 2002 г. SARS-CoV и бета-коронавирусы, подобные SARS-CoV (SARS-like).

• **РНК-ВК** – внутренний контрольный образец, который добавляется в каждую пробирку с анализируемым образцом, **предназначен для оценки этапа выделения РНК** и качества прохождения ПЦР.

• **Высокая аналитическая чувствительность – 500 копий нуклеиновой кислоты/мл исходного образца (или 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку)** при использовании комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот «ПРОБА-НК» (ООО «НПО ДНК-Технология») дает возможность диагностировать РНК вируса в образцах биологического материала даже с низкой концентрацией. Диагностическая чувствительность – 100%, диагностическая специфичность – 100%.

• **Широкий спектр биоматериала соответствует рекомендациям ВОЗ и МЗ РФ:** мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота.

• **Технология one-step** – обратная транскрипция и ПЦР (ОТ-ПЦР) «в одной пробирке», оптимизация процесса постановки исследования.

* При соблюдении следующих условий: биоматериал – мазок из носоглотки и ротоглотки; малое количество образцов (до 12-ти); пробоподготовка – набор реагентов «ПРОБА-НК-S» (ООО «ДНК-Технология ТС»); проведение этапа амплификации на приборе «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

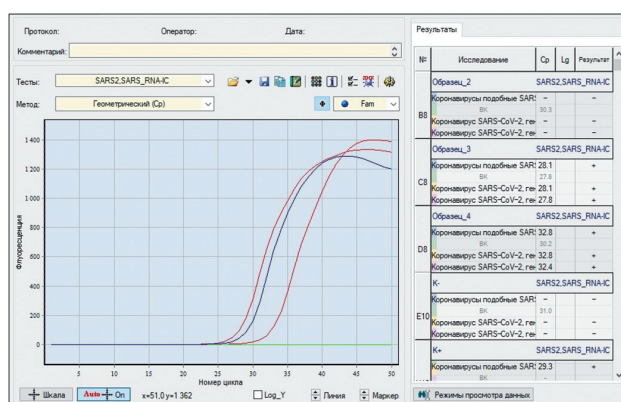
- **Мультиплексный анализ:** выявление трех мишеней в геноме SARS-CoV-2 *Betacoronavirus* и РНК-ВК.
- **Технология «горячего старта» с фасовкой** амплификационной смеси **под парафин** значительно **снижает риск контаминации ампликонами** при постановке, особенно при большом потоке исследований в лаборатории.
- **Наборы реагентов выпускаются только в проверенном пластике:** пробирки и стрипы проходят входной контроль ОТК.
- **Комплексное решение от производителя:** рекомендовано использовать оригинальное оборудование – амплификаторы детектирующие серии «ДТ» («ДТлайт», «ДТпрайм» или ДТ-96, ООО «НПО ДНК-Технология») с модулем программного обеспечения для автоматического формирования бланка заключения с интерпретацией результатов исследования (рис. 2).
- Для взятия, хранения и транспортирования биологического материала рекомендовано использование **транспортной среды для биопроб «СТОП-Ф»:**
 - состав транспортной среды гарантирует **высокую сохранность ДНК и РНК** в биологическом материале в течение 48 часов при температуре +18... +25 °С и в течение 7 суток при температуре +2... +8 °С;
 - наличие консерванта препятствует размножению неспецифических микроорганизмов, что позволяет стандартизовать условия последующего ПЦР-анализа.

Практические аспекты лабораторной диагностики коронавируса SARS-COV-2

Обращаем особое внимание, что диапазон вирусной нагрузки SARS-CoV-2 может варьировать в широких пределах от очень низких значений (10^4 и менее копий/мл) в биоматериале от лиц с бессимптомным носительством и лиц на стадии выздоровления до крайне высоких значений (более 10^9 копий/мл) в биоматериале от пациентов с клинической картиной острой вирусной пневмонии. В связи с этим, при выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации биоматериалом в лаборатории рекомендуется выполнение следующих правил:

1. Необходимо проводить визуальную оценку поступившего биоматериала и выбраковку всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.
2. По возможности выделять в отдельный поток образцы от пациентов из стационара с симптомами острой инфекции и анализировать их отдельно от остальных образцов (биоматериал для скрининга контактировавших лиц и пациентов с легким течением заболевания). Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательно выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.
3. Обязательно выполнять постановку отрицательных контрольных образцов, начиная с этапа выделения РНК, в каждом протоколе.
4. Использовать на всех этапах исследования наконечники с аэрозольными фильтрами.
5. Четко соблюдать методику выполнения исследования, открывать пробирки типа *Eppendorf* при помощи пинцета (не допускать касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки); при внесении реагентов не касаться наконечником пробирки (если это произошло, сразу заменить наконечник).



Соблюдение вышеописанных рекомендаций позволит получать корректные результаты при использовании высокочувствительного метода ОТ-ПЦР как при работе с высококопийными образцами при проведении дифференциальной диагностики, так и при обследовании контактировавших лиц, а также при проведении скрининга с целью предотвращения дальнейшего распространения инфекции.

А

Результат исследования методом полимеразной цепной реакции

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_2

№	Название исследования	Результаты
1	Коронавирусы подобные SARS-CoV	не выявлено
2	Коронавирус SARS-CoV-2, ген E	не выявлено
3	Коронавирус SARS-CoV-2, ген N	не выявлено

Исследование выполнил _____ Дата _____
Подпись _____

Б

Результат исследования методом полимеразной цепной реакции

Дата
Номер пробирки
Ф.И.О. пациента
Пол
Возраст
Организация
Врач
Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец_3

№	Название исследования	Результаты
1	Коронавирусы подобные SARS-CoV	ОБНАРУЖЕНО
2	Коронавирус SARS-CoV-2, ген E	ОБНАРУЖЕНО
3	Коронавирус SARS-CoV-2, ген N	ОБНАРУЖЕНО

Исследование выполнил _____ Дата _____
Подпись _____

Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени (приборы серии «ДТ») с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2/SARS-CoV»:

А) отрицательный результат;
Б) положительный результат.

Технические характеристики:

- Набор реагентов рассчитан на проведение 96 исследований, включая положительный и отрицательный контрольные образцы. Расфасован в пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (варианты фасовки: 96 отдельных пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок) – все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.
- Адаптация к детектирующим амплификаторам серии «ДТ» (ООО «НПО-ДНК-Технология»), Rotor-Gene Q (компания QIAGEN, Германия), CFX96 (компания Bio-Rad, США).
- Срок годности – 12 месяцев.
- Температура хранения:
 - фермент Taq/RT хранить при температуре -18... -22 °С;
 - пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительный контрольный образец хранить при температуре +2... +8 °С.
- Транспортирование набора реагентов – не более 5 суток в термоконтейнерах при температуре внутри контейнера до +25 °С.

Внимание! Согласно Временным методическим рекомендациям МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» для проведения дифференциальной диагностики у всех заболевших проводят исследования методом ПЦР на возбудители респираторных инфекций: вирусы гриппа типа А и В, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, метапневмовирусы, MERS-CoV.

Компания «ДНК-Технология» предлагает наборы реагентов для выявления возбудителей вирусных (в том числе, *Alphacoronavirus* HCoV-229E и HCoV-NL63 и *Betacoronavirus* HCoV-OC43 и HCoV-NKU1) и бактериальных респираторных инфекций методом ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Наименование	Определяемые показатели	Количество исследований	Регистрационное удостоверение
«ОРЗ ВирусКомплекс» Набор реагентов для выявления НК возбудителей респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени	Human respiratory syncytial virus Human coronavirus OC43 Human parainfluenza virus type 1 Human parainfluenza virus type 2 Human parainfluenza virus type 3 Human parainfluenza virus type 4 Human rhinovirus Human adenovirus Human metapneumovirus Human coronavirus 229E Human coronavirus NL63 Human coronavirus HKU1	24	№ ФСР 2011/12016
«Пан H1N1» Набор реагентов для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1), подобных штамму A/California/04/2009 (свиной грипп), методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции	Пан H1N1	48	№ ФСР 2010/07921
«Influenza A&B virus» Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А и В с детекцией в режиме реального времени	Influenza A Influenza B	48	№ ФСР 2011/12014
«Influenza B virus» Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа В с детекцией в режиме реального времени	Influenza B	48	№ ФСР 2011/12014
«Influenza A virus» Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А с детекцией в режиме реального времени	Influenza A	48	№ ФСР 2011/12014

Рекомендуемый набор реагентов для выделения ДНК/РНК:

- «ПРОБА-НК-S» или «ПРОБА-НК» производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Рекомендуемая транспортная среда для биопроб:

- «СТОР-Ф» производства ООО «ДНК-Технология ТС».

Адаптированы к амплификаторам детектирующим серии «ДТ»:

- «ДТлайт», «ДТпрайм» или ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Автоматическая интерпретация результатов исследования с использованием программного обеспечения для амплификаторов детектирующих серии «ДТ».

Внимание! Информация, содержащаяся в рекламном буклете, может не совпадать с актуальной версией спецификации на указанный продукт. Версия 123-5.



123-5 2021.03.11

Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология». Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125Ж, корп. 6.
Тел./факс: +7 (495) 640-17-71. www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru.

Служба клиентской поддержки:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный), hotline@dna-technology.ru.

