

## Практические аспекты лабораторной диагностики коронавируса SARS-CoV-2

**ВНИМАНИЕ!** 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.

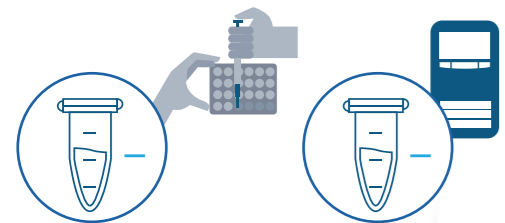
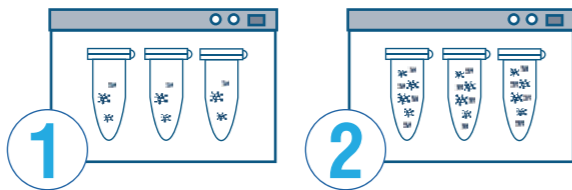
При выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации рекомендуется выполнение следующих правил:



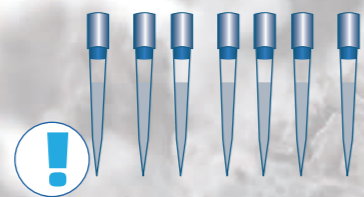
**1.** Проводите **визуальную оценку** биоматериала и **выбраковку** всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.

**2.** Выделяйте в **отдельный поток образцы от пациентов с симптомами острой инфекции** и анализируйте их отдельно от остальных образцов. Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательно выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.



**3.** **Обязательно выполняйте постановку отрицательных контрольных образцов**, начиная с этапа выделения РНК, в каждом протоколе.

**4.** Используйте **наконечники с аэрозольными фильтрами** на всех этапах исследования.



**5.** Четко соблюдайте методику выполнения исследования, открывайте 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.

## Технические характеристики

Версия 124-3



Набор реагентов рассчитан на проведение **96 исследований**, включая положительный и отрицательный контрольные образцы.



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.



Адаптация к **детектирующим амплификаторам серии «ДТ»** (ООО «НПО-ДНК-Технология»), **Rotor-Gene Q** (компания QIAGEN, Германия), **CFX96** (компания Bio-Rad, США).



Формат фасовки — пробирки **со смесью** для амплификации **под парафином**:

- для приборов серии ДТ (ООО «НПО-ДНК-Технология») рекомендован вариант исполнения в стрипах (8x0,2 мл);
- для приборов Rotor-Gene (Qiagen) — строго вариант исполнения в отдельных пробирках 0,2 мл.
- для приборов CFX96 (Bio-Rad) — возможно исполнение в стрипах (8x0,2 мл) и в отдельных пробирках 0,2 мл.



Срок годности — **12 месяцев**.



### Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология». Адрес: г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125ж, корп. 6, эт. 5, комн. 14. 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



124-3 2021.03.11

### 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 (набор «Influenza A&B virus», № ФСР 2011/12014; набор «Influenza A virus», № ФСР 2011/12014; набор «Influenza B virus», № ФСР 2011/12014), респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, риновирусы, аденовирусы, метапневмовирусы, MERS-CoV (набор «ОРЗ ВирусКомплекс», № ФСР 2011/12016).

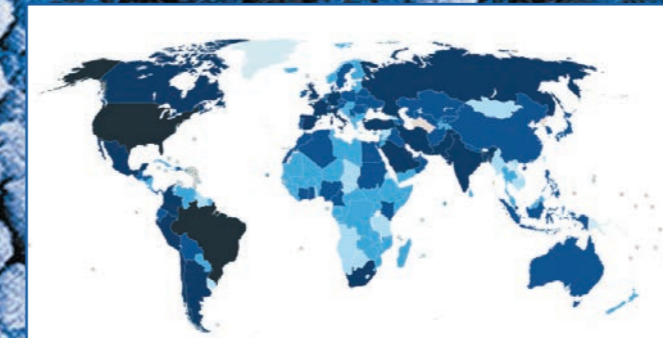


Рис. 1. Схема распространения коронавируса COVID-19 в мире (<https://en.wikipedia.org/>)



Согласно Временным методическим рекомендациям МЗ РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» лабораторная диагностика коронавирусной инфекции основывается на выявлении РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР.



Для подтверждения COVID-19 ВОЗ рекомендует метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией вирусной РНК.

С целью повышения надежности диагностики в качестве мишеней предлагается использовать не менее двух участков генома вируса — ген нуклеокапсида (N) и один из дополнительных маркеров (таблица 1).



# SARS-CoV-2/ SARS-CoV

## Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени РЗН № 2020/9948

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



Респираторная вирусная инфекция может протекать бессимптомно, иногда — с осложнениями, клинические проявления варьируют от легкого кашля до острой пневмонии. Наибольшую опасность респираторные вирусные инфекции представляют для людей с хроническими заболеваниями, пожилых людей, беременных женщин и новорожденных. Большинство видов коронавирусов вызывают круглогодичные ОРВИ, 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. 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку новой коронавирусной инфекции COVID-19 пандемией (рис.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>

В соответствии с документами ВОЗ и методическим рекомендациям МЗ РФ компания «ДНК-Технология» разработала набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV). Качество набора подтверждено международным сертификатом QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics), Великобритания. Набор входит в Перечень диагностических наборов реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 Европейской комиссии.

### Конкурентные преимущества набора:

#### 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.



#### Технологические преимущества:

- обратная транскрипция и ОТ-ПЦР «в одной пробирке»;
- мультиплексный анализ;
- снижение риска контаминации ампликонами — фасовка реагентов под парафин;
- время проведения исследования — от 2 ч.\*



#### Автоматический анализ результатов:

- интеллектуальное ПО для приборов серии «ДТ»;
- готовый бланк результатов исследования;
- удобная графическая визуализация.



#### 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.

\* 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»).

### Минимизация рисков получения ложноотрицательных результатов

по причине возникновения новых мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2 и **повышение надежности** диагностики достигается за счет авторских ноу-хау:



#### 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 «ПРОБА-НК» (ООО «НПО ДНК-Технология»). 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.



**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).



А

#### Результат исследования методом полимеразной цепной реакции

Дата 18 апреля 2020, 14:51:33  
 Номер пробирки  
 Ф.И.О. пациента  
 Пол  
 Возраст  
 Организация  
 Врач  
 Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец\_8

| № | Наименование теста             | Результат   |
|---|--------------------------------|-------------|
| 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 |

#### Заключение:

РНК коронавируса подобных SARS-CoV не обнаружена, РНК SARS-CoV-2 не обнаружена

Исследование выполнил  
 Дата  
 Подпись

Б

#### Результат исследования методом полимеразной цепной реакции

Дата 18 апреля 2020, 14:51:33  
 Номер пробирки  
 Ф.И.О. пациента  
 Пол  
 Возраст  
 Организация  
 Врач  
 Примечание

Логотип

Информация о лаборатории

Идентификатор образца: Образец\_4

| № | Наименование теста             | Результат  |
|---|--------------------------------|------------|
| 1 | Коронавирусы подобные SARS-CoV | ОБНАРУЖЕНО |
| 2 | Коронавирус SARS-CoV-2, ген E  | ОБНАРУЖЕНО |
| 3 | Коронавирус SARS-CoV-2, ген N  | ОБНАРУЖЕНО |

#### Заключение:

Обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2\*

\* Не исключено одновременное присутствие в образце РНК коронавируса SARS-CoV2 и другие коронавирусы подобных SARS-CoV

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.