

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.

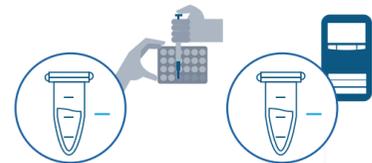
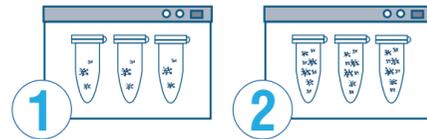
При выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных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

Для предупреждения кросс-контаминации рекомендуется выполнение следующих правил:



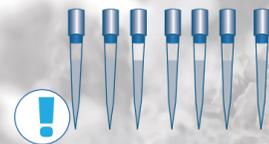
1. Проводите **визуальную оценку** биоматериала и **выбраковку** всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.

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 $-18... -22$ °C;
- пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительный контрольный образец хранить при температуре $+2... +8$ °C.



Транспортирование набора реагентов — **не более 5 суток в термоконтейнерах** при температуре внутри контейнера до $+25$ °C.



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.*



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.

Автоматический анализ результатов:

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



* 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: _____

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: _____

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.