



Инструкция к набору для определения
нуклеиновых кислот PerkinElmer®
SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR Assay
IVD Kit
(Методом ПЦР с флуоресцентными
зондами)

Для медицинской диагностики

Продукт для медицинской диагностики.

Название продукта

Общее название: Набор для определения нуклеиновых кислот Нового Коронавируса (2019-nCoV) методом ПЦР с флуоресцентными зондами - PerkinElmer® SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR Assay IVD Kit (PCR- Fluorescent Probe Method)

Фасовка

В наборе 48 тестов

Использование

Этот набор предназначен для качественного выявления Нового Коронавируса (2019-nCoV) с использованием мазка из горла, мазка из носоглотки, бронхоальвеолярной жидкости, образцов мокроты, сыворотки и плазмы. Результаты могут использоваться для вспомогательной диагностики и для эпидемиологических исследований.

Принцип действия

В этом наборе используется метод ПЦР с флуоресцентными зондами (метод Roche® TaqMan®) для обратной транскрипции, амплификации и выявления РНК Нового Коронавируса (2019-nCoV) *in vitro*. Набор выявляет консервативные специфические области гена N и гена ORF1ab в геноме Нового Коронавируса (2019-nCoV) в качестве последовательностей-мишеней для витроамплификации с несколькими мишенями, чтобы избежать ложных результатов из-за мутации вируса.

В этом наборе используется неконкурентный внутренний контроль РНК для мониторинга всего процесса детекции, включая выделение нуклеиновых кислот и проведение амплификации, чтобы избежать ложноотрицательных результатов. Зонды детектирования и зонды внутреннего контроля различных фрагментов детектирования несут флуоресцентные репортерные группы и гасящие группы, которые отличаются спектрами излучения при разных длинах волн.

В набор входит UNG-dUTP для предотвращения контаминации. Перед амплификацией UNG добавляют к реакционной смеси и инкубируют при 37 °С в течение двух минут для достаточного снижения уровня контаминации в пробирке, чтобы исключить ложно-положительные результаты теста.

1. Состав набора

Фасовка	48 тестов/набор		Компоненты
Название компонента	Объем и количество		
nCoV реакционный раствор А	950 мкл	X 1	Буферы, ионы магния dNTPs
nCoV реакционный раствор В	230 мкл	X 1	Буфер, зонд
nCoV смесь ферментов	170 мкл	X 1	Taq-полимераза, обратная транскриптаза RНазин, UNG фермент
nCoV внутренний контроль	390 мкл	X 1	Буфер, MS2 Флаг
nCoV положительный контроль	1,4 мл	X 1	2019-nCoV положительная РНК псевдовируса
nCoV отрицательный контроль	1,4 мл	X 1	Буфер

Примечания: 1) Контрольные материалы и другие компоненты набора следует рассматривать как потенциальные источники заражения. 2) Этот набор адаптирован для технологии амплификации нуклеиновых кислот для их обнаружения, поэтому использование этого набора должно строго соответствовать соответствующим требованиям лаборатории. 3) Компоненты из разных партий наборов не взаимозаменяемые

2. Необходимые материалы, не входящие в состав набора

2.1 Реагент для выделения нуклеиновых кислот: PerkinElmer nucleic acid extraction kit (например, chemagic™ Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (кат # CMG-1033)). Если для выделения используются другие наборы, они должны пройти валидацию для детекции коронавируса.

2.2 Приборы и программное обеспечение: chemagic™ 360, chemagic™ Prime или любой другой прибор для автоматической или полуавтоматической детекции нуклеиновых кислот с соответствующим программным обеспечением, обеспечивающим анализ полученных данных, центрифуга, вортекс.

2.3 Штатив для пробирок с образцом, штатив для реакционных пробирок.

2.4 Одноразовые расходные материалы: наконечники с фильтром, емкости для реагентов, плашки, магнитный штатив, реакционные пробирки, 8-луночный стрип или 96-луночный планшет для ПЦР и т. д.

2.5 Средства обработки - 75% спирт, гипохлорит. дез-средство.

Условия и сроки хранения

1. Температура хранения: -25 to -15°C.
2. Срок хранения: Набор хранится в течении 6 месяцев. Дата производства и срок годности указаны на упаковке.
3. После вскрытия все реагенты должны быть использованы в течении месяца.
4. Перед применением все компоненты набора необходимо довести до комнатной температуры. Нежелательно превышать 6 циклов заморозки-разморозки.
5. Стабильность при транспортировке - набор сохраняет свои свои качества при транспортировке не более 6 дней при температуре -25 to -15°C.

Совместимые приборы

Амплификаторы нуклеиновых кислот: Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, LightCycler® 480 System, Slan 96P Real Time PCR System, Bio-Rad CFX 96, Rotor-Gene.

Требования к образцу

1. Отбор образцов

Все типы образцов должны быть собраны в соответствии с требованиями клинических испытаний.

1.1 Мазок из гортани: Протрите билатеральную миндалину и заднюю стенку гортани при помощи ватной палочки и поместите ее в 3 мл раствора для консервации вируса (можно использовать изотонический физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером или раствор для тканей), отломите хвост и закройте пробирку.

1.2 Мазок из носоглотки: Одноразовый ватный тампон или пробоотборник с транспортным раствором введите в носоглотку и аккуратными вращательными движениями в течении 10-15 секунд произведите отбор образца. Сразу после этого поместите в пробоотборник в среду с транспортным раствором.

1.3 Аккуратно вставьте в носовой мышцелок носового прохода, на некоторое время остановитесь и медленно поворачивая выйдите из прохода. Таким же образом проведите отбор из второй ноздри. Поместите тампон в среду с транспортным раствором

1.4 Альвеолярный лаваж: после местной анестезии бронхоскоп вводят через правую среднюю долю или глотку через рот или нос, через левый легочный срез языка, который закрывает кончик отверстия бронхиального отростка, в транстрахеальное отверстие медленно добавляется стерильная биопсическая жидкость, соляная, 30 – 50 мл, всего 100 – 250 мл, объем не должен превышать 300 мл.

1.5 Мокрота: после того, как пациент глубоко кашляет, соберите кашляющую мокроту в 50 мл пластиковую пробирку с винтом, содержащую 3 мл раствора для отбора проб. Добавьте свежеприготовленный рабочий раствор дитиотреитола (DT) (рекомендуемая концентрация: 0,75% мас. / Об.) До конечной концентрации DT примерно 0,15% мас. / Об. После перемешивания нагревайте в течение 30 минут при 37 ° C, доведите до комнатной температуры или низкой температуры, далее проведите центрифугирование при 10000 × g в течение 10 минут. Отделите жидкость от осадка и добавьте 1 мл консервирующего раствора (содержащего 5% фетальной сыворотки теленка или физиологический раствор для поддержания рекомендуемой поддерживающей среды), встряхните, чтобы перемешать.

1.6 Образцы сыворотки: образцы крови объемом 5 мл, собранные в вакуумных пробирках для сбора крови с отрицательным давлением, оставляют при комнатной температуре на 30 минут и центрифугируют при 1500-2000 об / мин в течение 10 минут. Сыворотку собирают в стерильные винтовые пластиковые пробирки.

1.7 Образец плазмы: венозная кровь субъекта вводится в пробирку для разделения плазмы (антиангулянт может быть цитратом или солью ЭДТА; не используйте антикоагулянты на основе гепарина; рекомендуется использовать пробирки для разделения плазмы с инертным гелем для разделения). Для сбора образцов цельной крови и последующего отделения и обработки плазмы рекомендуется обратиться к рабочим требованиям инструкции по эксплуатации пробирки для забора крови. Если в руководстве нет соответствующих инструкций, рекомендуется осторожно переворачивать пробирку 5-10 раз после сбора и центрифугировать при $1500 \sim 1800 \times g$ в течение 20 минут. Постарайтесь предотвратить выпадение фибрина и т. д. Во время процесса отделения образца плазмы, избегайте засорения наконечников.

2. Хранение образца

Собранные неразделенные образцы цельной крови необходимо хранить при $2-25^{\circ}C$ и центрифугировать в течение 24 часов после сбора для получения сыворотки или плазмы. Образцы глотки, мазки из носа, жидкости альвеолярного лаважа, образцы мокроты, сыворотки и плазмы могут храниться при температуре от 2 до $8^{\circ}C$, если тестирование проводится в течение 24 часов. Если образец не может быть протестирован вовремя, его следует хранить при температуре от -25 до $-15^{\circ}C$, перед тестированием необходимо его разморозить, так он может храниться до одного месяца. Если образец необходимо хранить в течение длительного времени, держите его при температуре ниже $-70^{\circ}C$. Не следует проводить замораживание и оттаивание образцов крови. Повторное замораживание и оттаивание также следует избегать для мазков из горла, мазков из носа, альвеолярного лаважа, мокроты, сыворотки и образцов плазмы. Максимально допустимое количество повторных заморозок и оттаиваний составляет 5 раз.

3. Транспортировка образцов

Собирая образцы для транспортировки, следуйте соответствующим инструкциям. Неразделенные образцы крови должны транспортироваться при температуре хранения $2-25^{\circ}C$ и центрифугироваться в течение 24 часов после сбора. Образцы глотки, мазки из носа, жидкости альвеолярного лаважа, образцы мокроты, сыворотки и плазмы можно транспортировать при температуре хранения $2-8^{\circ}C$ или от -25 до $-15^{\circ}C$.

Проведение тестирования

1. Подготовка реагентов (в зоне пробоподготовки)

- 1.1 Достаньте растворы А и В, доведите их до комнатной температуры, встряхните на вортексе и отцентрифугируйте на низкой скорости в течении нескольких секунд.
- 1.2 В соответствии с фактическим количеством образцов, реакционный раствор ПЦР готовят в соответствии со следующим соотношением, которое может быть приготовлено вручную или автоматически с помощью оборудования.
- 1.3 Добавьте 20 мкл реакционного раствора ПЦР в каждую реакционную пробирку и перенесите ее в зону обработки образца.

2. Выделение нуклеиновых кислот (в зоне пробоподготовки)

Компонент	Объем
Раствор А	15 мкл / тест \times n
Раствор В	3 мкл / тест \times n
Смесь ферментов	2 мкл / тест \times n
Итого	20 мкл / тест

2.1 Извлеките положительный контроль nCoV и отрицательный контроль nCoV. После полного оттаивания контроли встряхивают и перемешивают и центрифугируют на низкой скорости в течение нескольких секунд.

2.2 Извлеките внутренний контроль nCoV, разморозьте при комнатной температуре, встряхните и перемешайте и центрифугируйте на низкой скорости в течение нескольких секунд.

2.3 Добавьте 5 мкл внутреннего контроля к элементам, перечисленным в 2.1, и тестируемому образцу, затем перейдите к выделению кислот.

3. Смешивание реакционной смеси (в зоне пробоподготовки)

3.1 Возьмите 40 мкл подготовленной ДНК тестового образца, положительный контроль, отрицательный контроль, автоматически или вручную добавьте их в реакционную смесь для ПЦР, закройте крышки или заклейте пленкой для запечатывания и смешайте, слегка встряхивая. Центрифугируйте для удаления пузырьков воздуха и перейдите в зону детекции.

4. Детекция ПЦР (в зоне амплификации)

4.1 Поместите пробирки или плашку в амплификатор

4.2 Задайте приведенный ниже протокол в амплификатор

Шаг	Температура	Время	Кол-во циклов
Шаг 1	37°C	2 минуты	1
Шаг 2	50°C	5 минут	1
Шаг 3	42°C	35 минут	1
Шаг 4	94°C	10 минут	1
Шаг 5	94°C	10 секунд	45
	55°C	15 секунд	
	65°C *	45 секунд	

*На финальном 5-м шаге произвести детекцию

цель анализа	IC	N	ORF1ab
канал детекции	VIC или HEX	FAM	ROX

IC: internal control - внутренний контроль; ORF1ab : 2019-nCoV ORF1ab специфический фрагмент; N : 2019-nCoV N специфический фрагмент

5. Настройки для анализа данных

5.1 Установка базовой линии (baseline): Принцип установки базовой линии заключается в том, чтобы установить ее в то место, где сигнал флуоресценции всех образцов в этом эксперименте экспоненциально стабилизируются. Установка может быть скорректирована в соответствии с фактической ситуацией (обычно номер цикла начальной точки начинается с 3-5 цикла, а номер цикла конечной точки обычно выбирается между 15-20 циклом), или прибор может автоматически интерпретировать его.

5.2 Установка пороговой линии (threshold): Установка порога устанавливается как наивысшая точка кривой отрицательного контроля. При установлении порога внутреннего контроля также используют точку экспоненциального роста отрицательного контроля. Разные приборы имеют разные пороговые значения Обратитесь к настройкам программного обеспечения.

6. Контроль качества

6.1 Этот продукт включает отрицательный контроль, положительный контроль и внутренний контроль для контроля достоверности всей серии экспериментальных результатов.

6.2 В результате отрицательного теста контроли (2019-nCoV) ORF1ab и N отрицательны, а значение внутреннего контроля Ct должно быть меньше или равно 40; при положительных результатах теста положительные контроли (2019-nCoV) ORF1ab и N оба являются положительными и значение Ct должно быть меньше или равно 35. Внутренний контроль не должен рассматриваться как положительный образец. Если отрицательные и положительные результаты контролей не соответствуют описанным выше, результаты испытаний всей постановки являются недействительными.

6.3 Внутреннего контроля: Если результат измерения образца отрицательный, результат внутреннего контроля должен быть положительным; в противном случае результат измерения образца недействителен и требует повторного измерения. При положительном результате измерения образца, результат внутреннего контроля может быть как положительным так и отрицательным.

Интерпретация результатов теста

Результаты теста:

	Ct			интерпретация результата
	IC	N	ORF1ab	
канал	VIC/ HEX	FAM	ROX	
образец	≤40	н/о	н/о	SARS-CoV-2 отрицательный
	NA	≤42	≤45	SARS-CoV-2 положительный
	NA	≤45	≤42	SARS-CoV-2 положительный
	NA	н/о	≤45	н/о, необходимо провести тест заново
	NA	≤45	н/о	н/о, необходимо провести тест заново
	NA	42<Ct≤45	42<Ct≤45	н/о, необходимо провести тест заново
	>40 or н/о	н/о	н/о	н/д, необходимо провести тест заново

NA: значения Ct не требуются.

Учет результатов повторного теста

предварительный тест		повторный тест		интерпретация результата
N	ORF1ab	N	ORF1ab	
н/о	≤45	н/о	≤45	Suspected SARS-CoV-2 положительный
		≤45	н/о	SARS-CoV-2 положительный
		≤45	≤45	SARS-CoV-2 положительный
		н/о	н/о	SARS-CoV-2 отрицательный
≤45	н/о	≤45	н/о	Suspected SARS-CoV-2 положительный
		н/о	≤45	SARS-CoV-2 положительный
		≤45	≤45	SARS-CoV-2 положительный
		н/о	н/о	SARS-CoV-2 отрицательный
42<ct≤45	42<ct≤45	≤45	н/о	SARS-CoV-2 положительный
		н/о	≤45	SARS-CoV-2 положительный
		≤45	≤45	SARS-CoV-2 положительный
			н/о	SARS-CoV-2 отрицательный

Ограничения

- Этот набор предназначен для качественного определения нуклеиновой кислоты коронавируса (2019-nCoV) из мазка из горла, мазка из носа и глотки, бронхоальвеолярного лаважа, мокроты, сыворотки, образцов плазмы. Результаты не отражают напрямую содержание нуклеиновых кислот патогена в образце.
- Этот набор подходит только для работы только с определенным типом образцов. Тестирование других типов образцов могут давать неточные результаты. Образцы, подлежащие испытанию, должны собираться, обрабатываться, храниться и транспортироваться в соответствии с условиями, указанными в инструкции. Неправильная подготовка и хранение образца могут привести к ошибочным результатам теста. Известно, что гепарин ингибирует реакции ПЦР, не допускается использовать гепарин-антикоагулированную плазму в качестве тестового образца.
- Для проведения выделения нуклеиновых кислот рекомендуется использовать наборы Te PerkinElmer chemagic™ Viral DNA/ RNA 300 Kit H96 (кат # CMG-1033) или приборы chemagic™ 360 the chemagic™ Prime. При использовании других наборов, они должны пройти валидацию.
- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, LightCycler® 480 System, Slan 96PReal Time PCR System, Bio-Rad CFX 96, Rotor-Gene, рекомендованы для проведения амплификации с использованием данного набора. Другие приборы перед использованием должны пройти валидацию.
- Минимальный предел обнаружения оценивается на основе предела достоверности обнаружения в 95%. При наличии патогена в концентрации, превышающей концентрацию в тестируемом образце, обнаружение будет иметь определенную вероятность нереактивных результатов. Когда в тестируемом образце присутствует патоген ниже концентрации, тест также покажет определенную вероятность реактивных результатов.
- Количество копий приводит к оценке минимального предела обнаружения этого набора: определяется методом цифровой ПЦР. Результаты измерений применимы только к данному набору, а числа копий, определенные другими методами, не обязательно эквивалентны.

Меры предосторожности

1. Этот продукт используется только для *in vitro* диагностики. Пожалуйста, внимательно прочитайте это руководство, прежде чем начать эксперимент. Набор предназначен для использования теми, кто прошел обучение в лаборатории ПЦР и имеет практические навыки.
2. При транспортировке набор хранить вертикально и не переворачивать
3. Перед использованием реагента проверьте пробирки на предмет утечек или повреждений. Каждый компонент в наборе следует разморозить при комнатной температуре, тщательно перемешать и центрифугировать перед использованием.
4. Контрольные материалы в наборе содержат компоненты человеческого происхождения. Хотя сырье и использованные образцы были инактивированы и прошли скрининг-тест крови на нуклеиновые кислоты, ни один из тестов не может обеспечить абсолютную безопасность, поэтому эти компоненты все равно следует рассматривать в качестве потенциального источника инфекции.
5. При неправильном обращении с контролями и образцами, возможна кросс-контаминация. Для аспирации реагентов и образцов рекомендуется использовать стерилизуемые пипетки и стерильные одноразовые наконечники с фильтрами.
6. Все образцы, подлежащие тестированию, и контроли в наборах должны рассматриваться как потенциально опасные вещества и эксплуатироваться и обрабатываться строго в соответствии с требованиями биобезопасности лаборатории. Работа и обработка образцов должны соответствовать требованиям соответствующих нормативных актов. Во время работы следует использовать стерильную одноразовую центрифужную пробирку и стерилизовать фильтрующим наконечником. При использовании наконечник рекомендуется выливать в емкость для жидких отходов, содержащую 10% раствор гипохлорита натрия. После завершения работы рабочую поверхность и поверхность инструмента следует очистить свежеприготовленным дезинфицирующим раствором, содержащим гипохлорит натрия, а затем очистить снова с помощью 75% этанола или чистой воды. Наконец, обработайте поверхности УФ-лампой в течение 30 минут.
7. Мультиканальный амплификатор, используемый для детекции с использованием данного набора должен быть откалиброван в соответствии с рекомендациями производителя.
8. Проведение ПЦР-исследований должны проводиться в четырех отдельных областях: зона хранения и подготовки реагентов, зона подготовки образцов, зона амплификации и зона анализа продукта амплификации. В зависимости от функций используемого инструмента, области могут быть соответствующим образом объединены. Каждая рабочая зона должна быть четко обозначена, чтобы избежать смешивания оборудования и предметов в разных рабочих зонах. Доступ к каждой рабочей зоне должен осуществляться в строгом соответствии с одним направлением движения, а именно: зона хранения и подготовки реагента → зона подготовки образца → зона амплификации → зона анализа продукта амплификации. Во время работы следует надевать необходимые средства индивидуальной защиты (защитные очки, рабочую одежду, головные уборы, обувь, перчатки и т. д.). Средства индивидуальной защиты следует заменять при входе и выходе из различных рабочих зон. Средства индивидуальной защиты в каждой рабочей зоне не должны использоваться крест-накрест.

ССЫЛКИ

1. *Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: World Health Organization*; 2020.
2. *Innis, MA, et Al, and the PCR Protocols Applications: A Laboratory Manual*, Academic, New York, 1989.
3. *Mahony JB. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. Clinical Microbiology Reviews. 2008; 21 (4): 716-747.*
4. *China CDC Virus Disease Control and Prevention. Novel coronavirus nucleic acid detection primer and probe sequences (Specific Primers and Probes for Detection Novel coronavirus 2019) [EB / OL], 2020-01-21.*
5. *Chinese Center for Disease Control and Prevention. Guidance for laboratory testing techniques for pneumonitis associated with novel coronavirus infection (second edition).*
6. *Measures for the management of clinical gene amplification test laboratories in medical institutions. Weiban Yizhengfa [2010] No. 194.*

За подробной информацией обратитесь: PKIAustin@PerkinElmer.com

PerkinElmer, Inc.
940 Винтер стрит
Волтхэм, МА 02451
USA: (800) 762-4000 or
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Для подробной информации посетите www.perkinelmer.com/ContactUs

Copyright ©2020, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc.
All other trademarks are the property of their respective owners.