Snibe Diagnostic

CE REF 132101002HB:50 тестов в наборе

Molecision™ SARS-CoV-2 RT-PCR Assay

НАЗНАЧЕНИЕ

Тестовый набор SARS-CoV-2 RT-PCR Assay предназначен для качественного определения в мазках из ротоглотки, носоглотки и в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) коронавируса SARS-CoV-2 при подозрении на COVID-19.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Вирус SARS-CoV-2, относящийся к роду бета-коронавирусов, представляет собой оболочечный вирус с одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности и является возбудителем коронавирусной инфекции 2019 (COVID-19). Некоторые коронавирусы, в том числе SARS-CoV-2, содержат в своей геномной последовательности ген ORF1ab (репликаза). Структурные гены S, E, M и N, кодирующие структурные белки — белок-шип, белок оболочки, мембранный белок и белок нуклеокапсида соответственно, являются общими для всех коронавирусов. В качестве праймеров и ДНК-зондов для анализа на SARS-CoV-2 были выбраны два высоко консервативных фрагмента (ORF1ab и N).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Тест SARS-CoV-2 RT-PCR Assay основан на одноэтапном методе ОТ-ПЦР, где в качестве мишеней для амплификации выступают гены коронавируса SARS-CoV-2 ORF1ab и N. Для гена ORF1ab сконструировано два специфических праймера и флуоресцентных зонда. Зонд для ORF1ab мечен флуоресцентным красителем FAM. Зонд для гена N мечен красителем ROX. Для обнаружения в образцах РНК SARS-CoV-2 используется метод мультиплексной ОТ-ПЦР. Данный тестовый набор также включает эндогенные внутренние стандарты (внутренние стандартные ДНК-зонды мечены красителем HEX) для сбора образцов и экстракции нуклеиновых кислот. Мониторинг процедуры анализа и процесса амплификации при ПЦР позволяет уменьшить количество получения ложноотрицательных результатов[1-2].

РЕАГЕНТЫ

Компоненты набора

Компонент	Характеристики	Количество	Описание
Реакционная смесь	1,5 мл в одном флаконе	1 флакон	Реагент для амплификации, ДНК-зонд и праймеры
Смесь ферментов	135 мкл в одном флаконе	1 флакон	Taq-полимераза, обратная транскриптаза и урацил-ДНК-гликозилаза
Положительный контроль	750 мкл в одном флаконе	1 флакон	Псевдовирусы с геномом-мишенью и внутренним контролем
Отрицательный контроль	200 мкл в одном флаконе	1 флакон	Вода, не содержащая нуклеаз

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Тестовый набор SARS-CoV-2 RT-PCR Assay следует хранить при температуре -20 (±5) °C.
- Замораживать и размораживать набор допускается не более 4 раз.
- Компоненты сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Не допускайте попадания прямых солнечных лучей.

СОВМЕСТИМЫЕ ПРИБОРЫ

Тестовый набор SARS-CoV-2 RT-PCR Assay может быть использован с системами LightCycler 480 II, LightCycler 480 и LightCycler 96 производства компании Roche, системами Life Technologies QuantStudio™ 3 и Life Technologies QuantStudio™ 5, системами CFX-96 и ABI 7500 производства компании Bio-rad, а также системой LineGene 9600 Plus Fluorescent Quantitative Detection System производства компании Bioer.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Для диагностики *in vitro*.
- Только для профессионального использования.
- При работе с любыми лабораторными реагентами необходимо соблюдать стандартные меры предосторожности.
- Не используйте набор по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- Компоненты разных комплектов реагентов или реагенты из разных партий не являются взаимозаменяемыми.
- Не допускайте образования пены в реагентах и тестируемых образцах любого типа (непосредственно в самих образцах, компонентах реакции и контрольных материалах).
- Все отходы, связанные с биологическими образцами, реагентами и расходными материалами, используемыми для анализа, следует считать потенциальными источниками инфекций и утилизировать в соответствии с местными нормативными требованиями.
- В зоне работы с реагентами и образцами запрещается принимать пищу, пить, курить, наносить косметику или надевать/снимать контактные линзы.
- Обеззараживание и утилизацию всех образцов, реагентов и других потенциально инфицированных материалов следует проводить в соответствии с местными нормативными требованиями.
- Обеззараживание и утилизацию всех потенциально инфицированных материалов следует проводить в соответствии с местными нормативными требованиями.
- При работе с образцами следует не допускать перекрестного загрязнения образцов. Образцы могут содержать вирусы или другие микроорганизмы в крайне высокой концентрации. Контейнеры с образцами не должны соприкасаться друг с другом. При утилизации отработанных материалов не следует проносить их над открытыми контейнерами. В случае попадания образцов на перчатки такие перчатки следует заменить.
- Управление лабораторией должно осуществляться в строгом соответствии с техническими требованиями, предъявляемыми к управлению лабораториями, в которых выполняется амплификация генов методом ПЦР. Проводить анализ должны только квалифицированные специалисты, прошедшие соответствующее обучение. Процесс анализа должен быть четко разделен. Расходные материалы должны быть стерилизованы для однократного применения и использованы в соответствии с предписанным этапом анализа. Изделия, предназначенные для разных рабочих зон, а также расходные материалы, используемые на разных этапах, предназначены только для конкретных рабочих зон и этапов и не являются взаимозаменяемыми.

ОБРАЗЦЫ

Взятие образцов

Выполните взятие свежих образцов из ротоглотки, носоглотки, а также взятие бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) у пациента с подозрением на наличие инфекции. Описанные далее процедуры взятия образца приведены лишь в качестве рекомендации. Ознакомьтесь с процедурами по взятию образцов, принятыми местными центрами контроля и профилактики заболеваний.

Типы образцов	Инструменты для взятия образца
Мазок из ротоглотки	Стерильные сухие тампоны и пробирки для образцов
Мазок из носоглотки	Стерильные сухие тампоны и пробирки для образцов
БАЛЖ	Стерильные сухие пробирки для образцов

Мазок из ротоглотки

Осторожно достаньте тампон из упаковки, вращательными движениями быстро поводите тампоном по небным дужкам, задней стенке глотки и миндалинам несколько раз с обеих сторон, прилагая при этом давление, чтобы собрать как можно больше секрета. Не прикасайтесь к языку. Отломите конец зонда и поместите рабочую часть зонда с тампоном в пробирку с раствором для образца. Плотно закрутите крышку пробирки во избежание утечки материала.

Мазок из носоглотки

Вводите тампон в ноздрю параллельно твердому небу (не вверх), пока не почувствуете сопротивление или пока расстояние не будет равно промежутку от уха до ноздрей пациента, что будет указывать на соприкосновение с носоглоткой. Тампон должен быть введен на глубину, которая соответствует расстоянию между ноздрей и наружным слуховым проходом. Аккуратно поводите и прокрутите тампоном. Оставьте зонд на несколько секунд для впитывания секрета. Медленно вращательными движениями извлеките зонд. При взятии мазков для обеих ноздрей можно использовать один и тот же тампоном. Отломите конец зонда и поместите рабочую часть зонда с тампоном в пробирку с раствором для образца. Плотно закрутите крышку пробирки во избежание утечки материала.

БАЛЖ

Взятие БАЛЖ выполняется у пациентов в тяжелом состоянии или при быстром развитии пневмонии. Врач выполняет забор ≥5 мл БАЛЖ в стерильный контейнер объемом 50 мл, на который наклеена этикетка со штрихкодом образца, и закручивает контейнер крышкой, следуя правилам асептики. Выполните забор образца, закрутите пробирку крышкой и запечатайте герметизирующей пленкой.

Пробирки для взятия образца

Перечисленные типы образцов были протестированы при использовании с пробирками для образцов, имеющимися в продаже на момент тестирования, это значит, что не все доступные пробирки всех производителей были протестированы. Изделия для сбора образцов разных производителей могут содержать различные материалы, что в некоторых случаях может повлиять на результаты анализа. При использовании пробирок для образцов необходим строго следовать инструкциям, предоставленным производителем.

Хранение и транспортировка образцов

- Образцы следует хранить в надлежащих условиях при температуре от 2 до 8 °C не более 24 часов. В случае отправки и обработки образцов позднее, чем через 24 часа, транспортировку образцов в лабораторию следует выполнять на сухом льду и при поступлении в лабораторию хранить в морозильной камере при температуре -70 °C или ниже.
- Указания по хранению и транспортировке образцов приведены лишь в качестве рекомендации. Транспортировка образцов должна осуществляться в соответствии с местными и международными нормативными требованиями, регламентирующими транспортировку инфекционных материалов.

ПРОЦЕДУРА

Материалы, входящие в комплект поставки

Тестовый набор SARS-CoV-2 RT-PCR Assay

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки (контрольный список)

- Расходные материалы без следов РНКаз/ДНКаз (одноразовые латексные или виниловые перчатки).
- Наконечники с фильтром для дозаторов и микропипетки (1–10 мкл, 10–100 мкл и 100–1000 мкл) без следов РНКаз/ДНКаз.
- Пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 96-луночный планшет для ПЦР (с герметизирующей пленкой), соответствующий указаниям производителя прибора.
- Микроцентрифужная пробирка объемом 1,5 мл без следов РНКаз/ДНКаз, настольная центрифуга, вортекс.
- Лед или блок охлаждения.
- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени.
- Набор или прибор для выделения РНК.
- Этанол.

Подготовка реагентов (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для подготовки реагентов)

- Извлеките из упаковки реакционную смесь и поместите ее в контейнер со льдом. После полной размороки встряхните и перемешайте смесь, а затем центрифугируйте для использования. Извлеките из упаковки смесь ферментов, предназначенную для детекции, центрифугируйте ее и поместите в контейнер со льдом для использования.
- Рассчитайте количество образцов (N), которые необходимо подготовить (N (кол-во образцов) + 1 пробирка с положительным контролем + 1 пробирка с отрицательным контролем). Подготовьте смесь для ПЦР в соответствии с данными, приведенными в таблице ниже, а затем добавьте приготовленную смесь по 30 мкл в каждую из восьми стрипованных пробирок, предназначенных для количественной ПЦР с флуоресцентной детекцией. После использования немедленно поместите реакционный раствор и раствор ферментов в холодильную камеру и храните при температуре -20 °C.

	Реакционная смесь (мкл)	Смесь ферментов (мкл)
Смесь для ПЦР (мкл)	27,5×N	2,5×N

Обработка образца (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для обработки образцов)

- Необходимо выполнить забор свежего образца, чтобы обеспечить надлежащее качество и количество материала РНК, необходимое для анализа. Для выделения РНК следует использовать соответствующий набор или прибор в соответствии с инструкциями производителя.
- Наборы QIAamp Viral RNA Mini Kit (52904 и 52906), Tiangen Viral RNA Extraction Kit (DP315-R) или Bioer MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit (BSC71S1E) были проверены и могут быть использованы для выделения РНК. Приборы MagNA Pure 96 компании Roche или полностью автоматизированная система очистки нуклеиновых кислот GenePure Pro компании Bioer были проверены и могут быть использованы для выделения РНК.
- Выделенную РНК необходимо сразу же исследовать или поместить на хранение при температуре -70 °C для дальнейшего исследования.

Добавление образцов (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для обработки образцов)

Добавьте в каждую установленную пробирку по 20 мкл каждой РНК, полученной во время обработки образца, РНК, выделенной из положительного контроля, и в конце РНК отрицательного контроля. Плотно закройте пробирку крышкой и центрифугируйте со скоростью 2000 об./мин в течение 10 с.

Амплификация при ПЦР в режиме реального времени (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для проведения амплификации)

Поместите реакционную пробирку в отсек для образцов прибора. Параметры настройки см. в инструкциях по эксплуатации прибора.

Сведения о каналах

Канал FAM используется для гена ORF1ab, канал ROX — для гена N, а канал HEX — для внутреннего контроля.

Параметры амплификации

Этап	Число повторов	Целевая температура (°C)	Время выполнения	Сбор данных
1	1	50	00:30:00	—
2	1	95	0:02:30	—
3	45	95	0:00:15	—
		60	0:00:30	√
4	1	25	0:00:30	—

После настройки сохраните файл и запустите программу.

Анализ данных

В качестве начальной и конечной точек базовой линии используются циклы 3 и 15 соответственно. Пороговое значение для каждого флуоресцентного канала следует задавать отдельно. Задайте пороговое значение вручную, которое будет чуть выше максимального уровня кривой отрицательного контроля (кривая фонового шума) в каналах FAM и ROX.

Контроль качества

Отрицательный контроль: значения Ct зарегистрированы для канала FAM, для каналов ROX и HEX данные отсутствуют.

Положительный контроль: для канала FAM регистрируется стандартная кривая, для каналов ROX и HEX — S-образная кривая и значения Ct не более 35.

Результат анализа считается действительным, если все указанные выше условия для проводимого анализа были выполнены. В противном случае результат считается недействительным, и требуется выполнение повторного анализа.

РЕФЕРЕНСНЫЙ ДИАПАЗОН

В ходе клинических исследований порогового значения было установлено, что референсный диапазон данного теста не превышает 40.

Расшифровка результатов

Положительный результат: наличие кривой амплификации для каналов FAM и (или) ROX со значением Ct ≤40, при этом значение Ct для канала HEX удовлетворяет требованиям (Ct ≤40 или значение Ct отсутствует).

Отрицательный результат: кривая амплификации для каналов FAM и ROX отсутствует или значение Ct >40, при этом значение Ct для канала HEX удовлетворяет требованиям (Ct ≤40).

Кривая для каналов FAM, ROX и HEX (значение Ct отсутствует) не зарегистрирована или значение Ct >40: такой результат указывает на слишком низкую концентрацию образца или на наличие интерферирующих веществ, препятствующих ходу реакции. Результаты анализа считаются недействительными. Необходимо обнаружить и исключить причины, препятствующие надлежащему проведению анализа. Повторите процедуру взятия и анализа образцов. (При получении недействительных результатов повторного анализа обратитесь в нашу компанию.)

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Результаты, полученные с помощью данного тестового набора, следует использовать только в информационных целях. При постановке диагноза и назначения лечения результаты данного теста следует интерпретировать с учетом симптомов, данными анамнеза, результатами других лабораторных тестов и ответа на лечение.
- Получение ложноотрицательных результатов анализа возможно в следующих случаях: 1) Взятие образцов, обработка и транспортировка без достаточных на то оснований, а также низкая концентрация образца могут привести к получению ложноотрицательных результатов. 2) Вариация целевой последовательности нового коронавируса SARS-CoV-2 или изменение последовательности, вызванное другими причинами, может привести к получению ложноотрицательных результатов. 3) Ненадлежащее хранение реагентов может привести к получению ложноотрицательных результатов. 4) Наличие интерферирующих веществ или ингибиторов ПЦР, которые не были исследованы, может привести к получению ложноотрицательных результатов.
- Перекрестное загрязнение образцов во время обработки приводит к получению ложноположительных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

результатов.

- Для получения достоверных результатов при использовании данного тестового набора взятие, транспортировка и хранение образцов и компонентов набора должны выполняться надлежащим образом. Разрушение вирусной РНК во время транспортировки или хранения может привести к получению ложноотрицательных результатов.
- Данный тестовый набор был одобрен для обнаружения только нуклеиновых кислот SARS-CoV-2 и не предназначен для обнаружения других вирусов или патогенов.

ОПРЕДЕЛЕННЫЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Предел обнаружения

По результатам исследования предела обнаружения было установлено, что минимальный обнаруживаемый уровень концентрации для данного тестового набора составляет 120 копий/мл.

Перекрестная реактивность

При наличии перечисленных ниже микроорганизмов в исследуемых концентрациях перекрестная реактивность с тестом не наблюдается.

Вещество, способное к перекрестной реактивности	Перекрестная реактивность отсутствует при концентрации не более
Синтетический коронавирус человека (HKU1) для количественного анализа	1x10⁵ TCID50/мл
Коронавирус человека OC43	1x10⁵ TCID50/мл
Коронавирус человека NL63	1x10⁵ TCID50/мл
Коронавирус человека 229E	1x10⁵ TCID50/мл
Коронавирус SARS человека	1x10⁵ TCID50/мл
MERS-CoV	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус гриппа A (H1N1)	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус гриппа A (H3N2)	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус гриппа A (H5N1)	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус гриппа A, серотип H7N9	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус гриппа B	1x10⁵ TCID50/мл
Респираторно-синцитиальный вирус человека	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус парагриппа человека 2 типа	1x10⁵ TCID50/мл
Риновирус человека 67	1x10⁵ TCID50/мл
Аденовирус человека 3 типа	1x10⁵ TCID50/мл
Энтеровирус человека 71 типа	1x10⁵ TCID50/мл
Синтетический метапневмовирус человека (hMPV) для количественного анализа	1x10⁵ TCID50/мл
Питательная среда для вируса Эпштейна-Барр	1x10⁵ TCID50/мл
Герпесвирус человека 5 типа	1x10⁵ TCID50/мл
Ротавирус A	1x10⁵ TCID50/мл
Вирус эпидемического паротита	1x10⁵ TCID50/мл
Mycoplasma pneumoniae	1x10⁵ TCID50/мл
Chlamydophila pneumoniae	1x10⁵ TCID50/мл
Legionella anisa	1x10⁶ КОЕ/мл
Bordetella pertussis	1x10⁶ КОЕ/мл
Гемофильная палочка	1x10⁶ КОЕ/мл
Staphylococcus aureus подвид. aureus Rosenbach	1x10⁶ КОЕ/мл
Streptococcus pneumoniae	1x10⁶ КОЕ/мл
Klebsiella pneumoniae подвид. pneumoniae	1x10⁶ КОЕ/мл
Микобактерии	1x10⁶ КОЕ/мл

Интерференция

Интерференция определялась с использованием тестового набора SARS-CoV-2 RT-PCR Assay: к образцам, содержащим различные аналиты в концентрации, соответствующей пределу обнаружения, были добавлены вещества, присутствие которых с большей вероятностью может вызывать интерференцию. При проведении исследования были получены следующие результаты, интерференции не наблюдалось.

Интерференция	Интерференция отсутствует при концентрации не более
Муцин	2,5 % w/v
Кровь	2 % v/v
Фенилэфрин	15 % v/v
Оксиметазолин	15 % v/v
Хлорид натрия	15 % v/v
Беклометазон	5 мкг/мл
Дексаметазон	5 мкг/мл
Флунизолид	5 мкг/мл
Триамцинолон	5 мкг/мл
Будесонид	5 мкг/мл
Мометазон	5 мкг/мл
Флутиказон	5 мкг/мл
Гистамина гидрохлорид	15 % w/v
Интерферон альфа	7,5 мг/мл
Занамивир	7,5 мг/мл
Рибавирин	7,5 мг/мл
Осельтамивир	7,5 мг/мл
Перамивир	7,5 мг/мл
Лопинавир	7,5 мг/мл
Ритонавир	7,5 мг/мл
Арбидол	7,5 мг/мл
Левофлоксацин	10 мг/мл
Азитромицин	10 мг/мл
Цефтриаксон	10 мг/мл
Меропенем	10 мг/мл
Тобрамицин	4 мкг/мл

Клинические характеристики

Клинические характеристики тестового набора SARS-CoV-2 RT-PCR Assay оценивались в рамках клинического исследования. Для оценки использовалось 374 уникальных образца естественного происхождения: 193 мазка из ротоглотки, 115 мазков из носоглотки и 66 образцов из БАЛЖ. Результаты сравнения для 209 положительных и 165 отрицательных образцов приведены в таблице ниже.

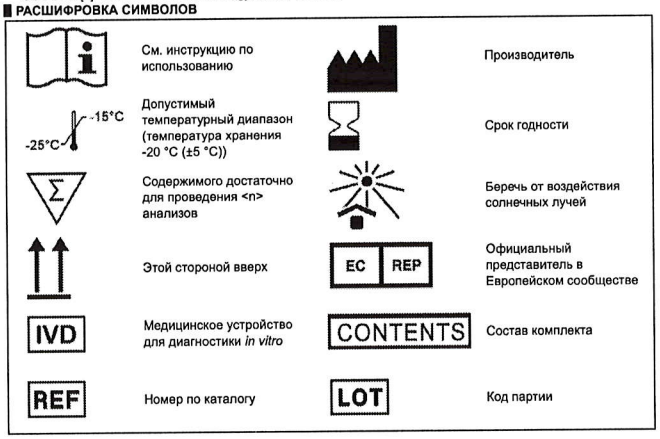
Сопоставление положительных и отрицательных результатов

Образец	Полученный/ожидаемый результат	Совпадение результатов	95 % ДИ
Положительный результат	209/209	100,0 %	99,9–100,0 %
Отрицательный результат	165/165	100,0 %	99,8–100,0 %
Всего	374/374	100,0 %	99,9–100,0 %

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Moës, Vijgen L, Keyaerts E, et al. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium[J]. BMC Infectious Diseases, 2005, 5.
2. Van Kasteren P B, van der Veer B, van den Brink S, et al. Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19[J]. Journal of Clinical Virology, 2020: 104412.

РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ



Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.
No.23, Jinxiu East Road, Pingshan District, 518122 Shenzhen, P.R. China
Тел.: +86-755-21536601 Факс: +86-755-28292740

EC REP

Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)
Eiffestrasse 80, 20537 Hamburg, Germany
Тел.: +49-40-251-31-75 Факс: +49-40-255726

КОПИЯ ВЕРНА
Теличко Д.О.
на основании доверенности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Snibe Diagnostic

CE REF 132101008HB: 50 тестов в наборе

Molecision™ — тестовый набор для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2

НАЗНАЧЕНИЕ

Тестовый набор для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 предназначен для качественного определения коронавируса SARS-CoV-2 в мазках из ротоглотки и носоглотки, а также в образцах мокроты при подозрении на COVID-19.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Вирус SARS-CoV-2, относящийся к роду бета-коронавирусов, представляет собой оболочечный вирус с одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности и является возбудителем коронавирусной инфекции 2019 (COVID-19). Некоторые коронавирусы, в том числе SARS-CoV-2, содержат в своей геномной последовательности ген ORF1ab (репликаза). Структурные гены S, E, M и N, кодирующие структурные белки — белок-шип, белок оболочки, мембранный белок и белок нуклеокапсида соответственно, являются общими для всех коронавирусов. В качестве праймеров и ДНК-зондов для анализа на SARS-CoV-2 были выбраны два высоко консервативных фрагмента (ORF1ab и N).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Тестовый набор для ОТ-ПЦР диагностики SARS-CoV-2 основан на одноэтапном методе ОТ-ПЦР, где в качестве мишеней для амплификации выступают гены коронавируса SARS-CoV-2 ORF1ab и N. В качестве праймеров и зондов были выбраны высококонсервативные олигонуклеотидные последовательности. Зонд для ORF1ab мечен флуоресцентным красителем FAM. Зонды для гена N мечены красителем ROX. Для обнаружения в образцах РНК SARS-CoV-2 используется метод мультиплексной ОТ-ПЦР. Данный тестовый набор также включает эндогенные внутренние стандарты (внутренние стандартные ДНК-зонды мечены красителем HEX) для сбора образцов и выделения нуклеиновых кислот. Мониторинг процедуры выделения и процесса амплификации при ПЦР позволяет снизить частоту случаев получения ложноотрицательных результатов[1-2].

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ)

Компонент	Количество	Характеристики	Описание
RT-PCR Mix	1 флакон	Лиофилизат, 1,8 мл в одном флаконе*	Зонды, праймеры, Taq-полимераза, обратная транскриптаза, урацил-ДНК-гликозилаза, dN(U)TPs
Положительный контроль	1 флакон	Лиофилизат, 0,75 мл в одном флаконе*	Псевдовирус SARS-CoV-2, псевдовирус с фрагментом РНКазы P человека
Отрицательный контроль	1 флакон	Жидкость, 0,75 мл в одном флаконе	Вода, не содержащая нуклеаз
Восстановительный раствор	1 флакон	Жидкость, 2,8 мл в одном флаконе	Вода, не содержащая нуклеаз

* После восстановления.

Примечание.

Смесь RT-PCR Mix и положительный контроль поставляются в лиофилизированной форме, поэтому перед использованием данные компоненты следует восстановить.

Во избежание загрязнения восстановительный раствор сначала следует использовать для восстановления смеси RT-PCR Mix.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ)

- Расходные материалы без следов РНКаз/ДНКаз (одноразовые латексные или виниловые перчатки).
- Наконечники с фильтром для дозаторов и микропипетки (1–10 мкл, 10–100 мкл и 100–1000 мкл) без следов РНКаз/ДНКаз.
- Пробирки, стрипы или планшеты для ПЦР, совместимые с прибором для проведения ПЦР согласно рекомендациям производителя прибора.
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл без следов РНКаз/ДНКаз.
- Центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, а также пробирки в стрипах или планшеты для ПЦР.
- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени.
- Набор для выделения нуклеиновых кислот.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Условия хранения

- Поставка тестового набора для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 осуществляется при температуре окружающей среды, однако после поступления хранить данный набор следует при температуре 2–8 °C.
- Компоненты сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетках.
- До вскрытия: набор следует хранить при температуре 2–8 °C в оригинальной упаковке; в таких условиях компоненты набора сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетках.
- В восстановленном состоянии: компоненты набора сохраняют стабильность в течение 6 месяцев в случае надлежащего хранения при температуре -20 °C; заморозку компонентов следует минимизировать до 2 циклов замораживания и размораживания.
- Не допускайте попадания света на входящую в набор смесь RT-PCR Mix.

СОВМЕСТИМЫЕ ПРИБОРЫ

Тестовый набор для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 может быть использован с указанными ниже приборами для проведения ПЦР в режиме реального времени:

Roche — LightCycler 480 II, система LightCycler 480 и LightCycler 96.

Thermo Fisher — система для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 7500, QuantStudio 3 и 5.

BIO-RAD — система для ПЦР в реальном времени CFX96 Touch System.

Bioer Technology — система для количественной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов LineGene 9600 Plus.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Для диагностики *in vitro*.
- Только для профессионального использования.
- При работе с любыми лабораторными реагентами необходимо соблюдать стандартные меры предосторожности.
- Следует принимать меры индивидуальной защиты с целью предотвращения попадания на какие-либо участки тела образцов, реагентов и использующихся при контроле качества материалов. Меры должны соответствовать местным требованиям к проведению анализа.
- Не используйте набор по истечении срока годности, указанного на этикетке.
- После вскрытия флакона с лиофилизатом следует незамедлительно выполнить восстановление его содержимого. Не допускайте попадания света на смесь RT-PCR Mix.
- Проводить проверки с помощью положительного и отрицательного контролей следует для каждого теста.
- Реагенты из разных партий или компоненты разных комплектов реагентов из одинаковых партий не являются взаимозаменяемыми.
- В обязательном порядке не допускайте контаминации реагентов микроорганизмами, рибонуклеазами (РНКазами) и дезоксирибонуклеазами (ДНКазами). Рекомендуется использовать стерильные, одноразовые, аэрозоль-устойчивые наконечники для дозаторов без следов РНКаз/ДНКаз или наконечники с прямым вытеснением.
- Не допускайте образования пены в реагентах и тестируемых образцах любого типа (непосредственно в самих образцах, компонентах реакции и контрольных материалах).
- В зоне работы с реагентами и образцами запрещается принимать пищу, пить, курить, наносить косметику или надевать/снимать контактные линзы.
- Образцы, а также все реагенты и материалы, которые соприкасались с образцами, следует рассматривать как потенциально инфекционные и/или биологически опасные материалы. Обращаться с такими материалами следует в соответствии с местными нормативными требованиями.
- При работе с образцами следует не допускать перекрестного загрязнения образцов. Образцы могут содержать вирусы или другие микроорганизмы в крайне высокой концентрации. Контейнеры с образцами не должны соприкасаться друг с другом. При утилизации отработанных материалов не следует проносить их над открытыми контейнерами. В случае попадания образцов на перчатки такие перчатки следует заменить.
- Управление лабораторией должно осуществляться в строгом соответствии с техническими требованиями, предъявляемыми к управлению лабораториями, в которых выполняется амплификация генов методом ПЦР. Проводить анализ должны только квалифицированные специалисты, прошедшие соответствующее обучение. Процесс анализа должен быть четко разделен.
- Расходные материалы должны быть стерилизованы для однократного применения и использованы в соответствии с предписанным этапом анализа. Изделия, предназначенные для разных участков или этапов процесса, не являются взаимозаменяемыми.
- Необходимо работать с образцами и реагентами в боксе микробиологической безопасности, при этом соблюдая местные требования к биологической безопасности.
- Если на основании текущих критериев клинического и эпидемиологического скрининга, рекомендованных органами общественного здравоохранения, имеются подозрения на инфицирование SARS-CoV-2, взятие образцов следует выполнять с соблюдением соответствующих мер предосторожности инфекционного контроля.

ОБРАЗЕЦ

Взятие образцов

Выполните взятие свежих образцов из ротоглотки и носоглотки, а также свежих образцов мокроты. См. рекомендации *Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* (Временные рекомендации по сбору, обработке и тестированию клинических образцов на COVID-19) на странице https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html.

Необходимо выполнить забор свежего образца, чтобы обеспечить надлежащее качество и количество материала РНК, необходимое для анализа. Взятие образцов должно проводиться квалифицированным персоналом, работающим в сфере здравоохранения. После взятия образца плотно закрутите крышку пробирки во избежание утечки материала. Применяются следующие методы взятия образцов:

Мазок из ротоглотки

Осторожно достаньте тампон из упаковки, вращательными движениями быстро поводите тампоном по небным дужкам, задней стенке глотки и миндалинам несколько раз с обеих сторон, прилагая при этом давление, чтобы собрать как можно больше секрета. Не прикасайтесь к языку. Поместите кончик тампона в пробирку со стерильной вирусной транспортной средой и отломите или отрежьте палочку-аппликатор.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Мазок из носоглотки
Голова пациента должна быть запрокинута назад на 70 градусов. Введите тампон в ноздрю. Тампон должен быть введен на глубину, которая соответствует расстоянию между ноздрей и наружным слуховым проходом. Оставьте тампон на несколько секунд для впитывания секрета. Медленно вращательными движениями извлеките тампон. Повторите процедуру для второй ноздри, используя тот же самый тампон. Поместите кончик тампона в пробирку со стерильной вирусной транспортной средой и отломите или отрежьте палочку-аппликатор.
Примечание. У младенцев взятие аспирата из носоглотки может быть невозможным.

Мокрота
Попросите пациента прополоскать рот водой, глубоко откашляться и выплюнуть откашлянную мокроту непосредственно в стерильный герметичный контейнер для сбора образцов с завинчивающейся крышкой или в сухой стерильный контейнер.

Хранение и транспортировка образцов
- Образцы можно хранить при температуре 2–8 °C до 24 часов.
- В случае отправки и обработки образцов позднее, чем через 24 часа, транспортировку образцов в лабораторию следует выполнять на сухом льду и при поступлении в лабораторию хранить в морозильной камере при температуре -70 °C или ниже. Транспортировка образцов должна осуществляться в соответствии с местными нормативными требованиями, регламентирующими транспортировку клинических образцов и инфекционных материалов.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка реагентов (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для подготовки реагентов)
- Аккуратно откройте флакон со смесью RT-PCR Mix, не допуская распада лиофилизата.
- Внесите в смесь RT-PCR Mix 1,8 мл восстановительного раствора. Оставьте флакон при комнатной температуре на 1–2 минуты для восстановления лиофилизата.
- Прежде чем перенести смесь на первый планшет, стрип или в пробирку во избежание образования пузырьков перемешайте содержимое флакона с помощью пипетки, набирая и выпуская смесь примерно 2–3 раза.
- Разделите и перенесите суспендированную смесь RT-PCR Mix в пробирки, на стрипы или планшеты (по 30 мкл на лунку).

Обработка образца (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для обработки образцов)
- После взятия образцов следует выделить РНК с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот. Для использования одобрены наборы с номерами по каталогу 132131001HC и 132131004HC.
- Внесите в положительный контроль 0,75 мл восстановительного раствора. Оставьте флакон при комнатной температуре на 1–2 минуты для восстановления лиофилизата.
- Перед амплификацией следует выполнить процедуру выделения для положительного контроля.
- Выделенную РНК необходимо сразу же исследовать или поместить на хранение при температуре -70 °C для дальнейшего исследования.

Добавление образцов (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для обработки образцов)
Общий объем ОТ-ПЦР составляет 50 мкл, как указано в таблице ниже. Плотно закройте пробирки, стрипы или планшеты и сразу же выполните центрифугирование в течение 10 секунд.

Общий объем (мкл)	Смесь RT-PCR Mix (мкл)	Образец (мкл)
50	30	20

Амплификация при ПЦР в режиме реального времени (выполняется в рабочей зоне, предназначенной для проведения амплификации)
Поместите пробирки, стрипы или планшеты для ПЦР в отсек для образцов прибора. Параметры настройки см. в инструкциях по эксплуатации прибора. Для примера рассмотрим LightCycler 480 II производства компании Roche (версия программного обеспечения 1.5.0). Настройка прибора для ОТ-ПЦР выполняется в соответствии с описанной далее процедурой.
1) Включите прибор Roche LightCycler 480 II, запустите программное обеспечение и нажмите **New Experiment** (Новый эксперимент).
2) В пункте **Detection Format** (Режим детекции) выберите **FAM/ROX/HEX**.
3) Настройте программу амплификации в меню **Program Name** (Название программы), сохраните программу как шаблон, нажав **Save As Template** (Сохранить как шаблон). Чтобы использовать шаблон при следующих экспериментах, достаточно будет нажать **Apply Template** (Применить шаблон). Выберите **Run Protocol** (Запустить протокол) в верхней строке меню, а затем «Start Run» (Начать процедуру).

Этап	Циклы	Температура (°C)	Время выполнения	Сбор данных
1	1	50	10 минут	—
2	1	95	2 минуты	—
3	45	95	10 секунд	—
		60	20 секунд	√

Примечание. Для всех приборов для проведения ОТ-ПЦР производства Roche, в том числе Roche LightCycler 480 II, требуется компенсация цвета. При необходимости обратитесь за помощью в компанию Roche, компанию Snibe или к официальному дистрибьютору.

Сведения о каналах
Канал FAM используется для гена ORF1ab, канал ROX — для гена N, а канал HEX/VIC — для гена РНКазы P человека (RP — внутренний контроль).

Анализ данных
В качестве начальной и конечной точек базовой линии используются циклы 3 и 15 соответственно. Пороговое значение для каждого флуоресцентного канала следует задавать отдельно. Задайте пороговое значение вручную, которое будет чуть выше максимального уровня кривой отрицательного контроля (кривая фонового шума) в каналах FAM и ROX.

Контроль качества
Отрицательный контроль: значения Ct для каналов FAM, ROX и HEX/VIC должны составлять >40 или значения Ct должны отсутствовать.
Положительный контроль: для канала FAM должны быть зарегистрированы стандартные кривые, значения для каналов ROX и HEX/VIC должны быть меньше или равны 35.
Результат анализа считается действительным, если все указанные выше условия для проводимого анализа были выполнены. В противном случае результат считается недействительным и требуется выполнение повторного анализа.

ПОРОГОВОЕ ЗНАЧЕНИЕ

По данным клинического исследования на основании ROC-кривой было определено, что пороговое значение для генов ORF1ab, N и RP — ≤40.

Расшифровка результатов

Результат теста			Заключение
FAM	ROX	HEX/VIC	
+	+	+/-	Положительный на SARS-CoV-2
-	-	+	Отрицательный на SARS-CoV-2
+	-	+	Предположительно положительный на SARS-CoV-2, требуется повторное тестирование
-	+	+	
+	-	-	Неопределенный результат, требуется повторное тестирование
-	+	-	
-	-	-	

Расшифровка результатов повторного тестирования
- Если при повторном тестировании для канала FAM или ROX получен положительный результат, для канала HEX/VIC — положительный или отрицательный результат, образец следует считать положительным.
- Если при повторном тестировании для канала FAM и ROX получен отрицательный результат, для канала HEX/VIC — положительный результат, образец следует считать отрицательным.
- Если при повторном тестировании для каналов FAM, ROX и HEX/VIC получен отрицательный результат, рекомендуется повторное взятие и тестирование образца.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Результаты, полученные с помощью данного тестового набора, следует использовать только в информационных целях. При постановке диагноза и назначения лечения результаты данного теста следует интерпретировать с учетом симптомов, данными анамнеза, результатами других лабораторных тестов и ответа на лечение.
- Указанные далее ситуации могут вызывать недостоверность результатов и приводить к получению ложноотрицательных результатов: 1) разрушение вирусной РНК вследствие несоблюдения правил сбора, обработки, хранения и транспортировки образцов; 2) вариативность целевых последовательностей нового коронавируса SARS-CoV-2 или изменение последовательностей, вызванное другими причинами; 3) неправильное хранение реагентов; 4) наличие неисследованных интерферирующих веществ или ингибиторов ПЦР; 5) ненадлежащие показатели вирусной нагрузки в образце; 6) недостаточный объем образца.
- Перекрестное загрязнение образцов во время обработки приводит к получению ложноположительных результатов.
- Данный тестовый набор был одобрен для обнаружения только нуклеиновых кислот SARS-CoV-2 и не предназначен для обнаружения других вирусов или патогенов.
- Указанные далее ситуации могут вызывать отрицательный сигнал внутреннего контроля (ВК): 1) сильная амплификация вируса-мишени может ингибировать амплификацию ВК; 2) кривые амплификации гена RP человека могут не проявляться в некоторых образцах из-за малого содержания клеток в первоначальном клиническом образце. Таким образом, отрицательный сигнал ВК не исключает присутствия РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом образце.

ОПРЕДЕЛЕННЫЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Предел обнаружения
По результатам исследования предела обнаружения было установлено, что минимальный обнаруживаемый уровень концентрации для данного тестового набора составляет 250 копий/мл. Данное исследование проводилось с использованием псевдовируса SARS-CoV-2, имеющихся в продаже панелей и клинических образцов. При концентрации, равной порогу обнаружения, для всех образцов в 95 % случаев всех измерений были получены положительные результаты.

Перекрестная реактивность
При наличии перечисленных ниже микроорганизмов в исследуемых концентрациях перекрестная реактивность с тестом не наблюдается.

Вещество, способное к перекрестной реактивности	Перекрестная реактивность отсутствует при концентрации не более
Коронавирус человека HKU1	$1x10^5$ $TCID_{50}$/мл
Коронавирус человека OC43	$1x10^5$ $TCID_{50}$/мл
Коронавирус человека NL63	$1x10^5$ $TCID_{50}$/мл
Коронавирус человека 229E	$1x10^5$ $TCID_{50}$/мл
Синтетический коронавирус SARS человека	$1x10^5$ копий/мл
Синтетический коронавирус MERS-CoV	$1x10^5$ копий/мл
Вирус гриппа A (H1N1)	$1x10^5$ $TCID_{50}$/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Вирус гриппа A (H3N2)	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Вирус гриппа A (H5N1)	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Вирус гриппа A, серотип H7N9	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Вирус гриппа B	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Респираторно-синцитиальный вирус человека	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Вирус парагриппа человека 2 типа	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Риновирус человека 67 типа	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Аденовирус человека 3 типа	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Энтеровирус человека 71 типа	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Синтетический метапневмовирус человека (hMPV), количественный	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Питательная среда для вируса Эпштейна-Барр	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Герпесвирус человека 5 типа	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Ротавирус A	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Вирус эпидемического паротита	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Mycoplasma pneumoniae	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Chlamydophila pneumoniae	1x10^5 TCID$_{50}$/мл
Legionella anisa	1x10^6 КОЕ/мл
Bordetella pertussis	1x10^6 КОЕ/мл
Гемофильная палочка	1x10^6 КОЕ/мл
Staphylococcus aureus, подвид aureus Rosenbach	1x10^6 КОЕ/мл
Streptococcus pneumoniae	1x10^6 КОЕ/мл
Klebsiella pneumoniae, подвид pneumoniae	1x10^6 КОЕ/мл
Микобактерии	1x10^6 КОЕ/мл

Интерференция

Интерференция определялась с использованием тестового набора для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2: к образцам с концентрацией, соответствующей пределу обнаружения, были добавлены вещества, присутствие которых с большей вероятностью может вызывать интерференцию. При проведении исследования были получены следующие результаты, интерференции не наблюдалось.

Интерферирующие вещества	Интерференция отсутствует при концентрации не более
Муцин	2,5 % w/v
Кровь	2 % v/v
Бета-адреномиметики	15 % v/v
Оксиметазолин	15 % v/v
Хлорид натрия	15 % v/v
Беклометазон	5 мкг/мл
Дексаметазон	5 мкг/мл
Флунизолид	5 мкг/мл
Триамцинолон	5 мкг/мл
Будесонид	5 мкг/мл
Мометазон	5 мкг/мл
Флутиказон	5 мкг/мл
Гистамина гидрохлорид	15 % w/v
Интерферон альфа	7,5 мг/мл
Занамивир	7,5 мг/мл
Рибавирин	7,5 мг/мл
Осельтамивир	7,5 мг/мл
Перамивир	7,5 мг/мл
Лопинавир	7,5 мг/мл
Ритонавир	7,5 мг/мл
Арбидол	7,5 мг/мл
Левофлюксацин	10 мг/мл
Азитромицин	10 мг/мл
Цефтриаксон	10 мг/мл
Меропенем	10 мг/мл
Тобрамицин	4 мкг/мл

СПОСОБНОСТЬ ОПРЕДЕЛЯТЬ РАЗНЫЕ ШТАММЫ

В настоящий момент различные изоляты SARS-CoV-2 для проверки тестового набора на способность определять разные штаммы вируса (инклюзивность) отсутствуют. Поэтому инклюзивность праймеров/зондов была оценена с помощью программы BLASTn и общедоступных последовательностей SARS-CoV-2. Праймеры и зонды продемонстрировали 100-процентную гомологию со всеми доступными последовательностями.

При проведении теста с помощью набора для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 мишенями являются уникальные участки генов ORF1ab и N генома вируса SARS-CoV-2. На тест не повлияют указанные ниже новые варианты коронавируса. Новые варианты были подтверждены по результатам анализа 20 образцов из различных регионов.

Место обнаружения штамма[3]	Номер штамма
Великобритания	B.1.1.7
Южная Африка	B.1.351
Бразилия	P.1
Индия	B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3

Клинические характеристики

Клинические характеристики тестового набора для ОТ-ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 оценивались в рамках клинического исследования. Для оценки клинических характеристик использовалось 350 уникальных образцов естественного происхождения: 99 мазков из ротоглотки, 213 мазков из носоглотки и 38 образцов мокроты. Результаты сравнения для 204 положительных и 146 отрицательных образцов приведены в таблице ниже.

Сопоставление положительных и отрицательных результатов

Образец	Полученный/ ожидаемый результат	Совпадение результатов	95 % ДИ
Положительные результаты	204/204	100,0 %	99,85–100,0 %
Отрицательные результаты	146/146	100,0 %	99,83–100,0 %
Всего	350/350	100,0 %	99,89–100,0 %

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Moës, Vijgen L, Keyaerts E, et al. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium[J]. BMC Infectious Diseases, 2005, 5.
2. Van Kasteren P B, van der Veer B, van den Brink S, et al. Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19[J]. Journal of Clinical Virology, 2020: 104412.
3. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant.html.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Molecision™ является товарным знаком компании Snibe. Все прочие названия продуктов и товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ

	См. инструкцию по использованию		Производитель
2°C 8°C	Допустимый температурный диапазон (хранить при температуре 2–8 °C)		Срок годности
Σ	Содержимого достаточно для проведения <n> анализов		Беречь от воздействия солнечных лучей
	Этой стороной вверх	EC REP	Официальный представитель в Европейском сообществе
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*	CONTENTS	Состав комплекта
REF	Номер по каталогу	LOT	Код партии
CE	Маркировка CE		Требуется восстановление

Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.
No.23, Jinxiu East Road, Pingshan District, 518122 Shenzhen, P.R. China
Тел.: +86-755-21536601 Факс: +86-755-28292740

EC REP **Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)**
Eiffestrasse 80, 20537 Hamburg, Germany
Тел.: +49-40-251-31-75 Факс: +49-40-255726

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КОПИЯ ВЕРНА
Теличко Д.О.
на основании доверенности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Snibe Diagnostic

CE REF 132131001HC: набор для 32 экстракций

Molecision™ Набор для экстракции нуклеиновых кислот

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для экстракции нуклеиновых кислот предназначен для выделения нуклеиновых кислот (НК) из материалов образцов для проведения анализа *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ ОБРАЗЦА

Набор позволяет избирательно выделять НК из следующих материалов образца.

Объект исследования	Материал образца
Вирусная НК	Плазма, сыворотка, цельная кровь, раствор для консервации образца мазков из ротоглотки и носоглотки
Геномная ДНК	Цельная кровь, клеточные культуры, свежезамороженная ткань
Внеклеточные НК человека	Плазма

Свежезамороженную ткань необходимо тщательно измельчить и растереть в жидком азоте.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА / КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Процедура выделения нуклеиновой кислоты основана на технологии, использующей в качестве твердой фазы покрытые диоксидом кремния магнитные стеклянные частицы[1].

Эта процедура состоит из следующих основных этапов:

1. Высвобождение нуклеиновых кислот в лизирующий буфер.
2. Связывание нуклеиновых кислот с поверхностью магнитных стеклянных частиц, покрытых диоксидом кремния, за счет образования водородных связей и электростатической адсорбции.
3. Выделение нуклеиновых кислот методом магнитной сепарации из лизата образца.
4. Отмывка в несколько этапов для удаления несвязанных веществ, например, белков, клеточного дебриса и ингибиторов ПЦР.
5. Элюция очищенных нуклеиновых кислот с магнитных стеклянных частиц с помощью элюирующего буфера.

РЕАГЕНТ

Компоненты набора

Компонент	Состав
Планшет для реагентов	2 планшета
Протеиназа К	320 мкл, 1 флакон
8-канальный наконечник	4 шт.

Планшет для реагентов состоит из 6 контейнеров для реагентов:

Контейнер	Компонент	Положение	Объем	Описание
1	Лизирующий буфер	Колонка 1/7	500 мкл/ячейка	Тиоцианат гуанидина
2	Промывочный буфер I	Колонка 2/8	600 мкл/ячейка	Гидрохлорид гуанидина, этанол
3	Промывочный буфер II	Колонка 3/9	600 мкл/ячейка	Трис-HCl, этилендиаминтетрауксусная кислота
4	Промывочный буфер III	Колонка 4/10	600 мкл/ячейка	Трис-HCl, этилендиаминтетрауксусная кислота
5	Элюирующий буфер	Колонка 5/11	80 мкл/ячейка	Трис-HCl
6	Магнитные стеклянные частицы	Колонка 6/12	150 мкл/ячейка	Магнитные стеклянные частицы

Колонка соответствует положению на планшете для реагентов, как показано ниже:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Лизирующий буфер	Промывочный буфер I	Промывочный буфер II	Промывочный буфер III	Элюирующий буфер	Магнитные стеклянные частицы	Лизирующий буфер	Промывочный буфер I	Промывочный буфер II	Промывочный буфер III	Элюирующий буфер	Магнитные стеклянные частицы
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для профессионального использования.
- Перед началом работы с набором внимательно изучите инструкции.
- Не используйте набор по истечении указанного на этикетке срока годности.
- Не используйте в одном наборе компоненты комплектов реагентов из разных партий.
- Во избежание контакта какой-либо части тела с образцами и реагентами при работе с ними всегда используйте средства индивидуальной защиты в соответствии с местными нормативными требованиями, например защитные одноразовые перчатки, лабораторный халат и средства защиты глаз.
- Не принимайте пищу, не пейте напитки и не курите в помещении лаборатории. Не берите пипетку в рот.
- В состав реагентов входят опасные или вредные вещества. При попадании реагента на кожу, слизистые или в глаза немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды. Прежде чем вытереть разлившийся реагент, разбавьте его водой.
- Избегайте контакта реагентов или отходов, содержащих тиоцианат гуанидина, с кислотами или раствором гипохлорита натрия. При смешивании этих веществ образуется высокотоксичный газ.
- Не допускайте микробного и нуклеазного загрязнения после вскрытия контейнера реагентов. Для отбора аликвот реагента из контейнера используйте пипетки со стерильными одноразовыми наконечниками.
- Чтобы избежать распространения загрязнения по воздуху, отработанные наконечники выбрасывайте в герметичные контейнеры для утилизации.
- Прикасайтесь к поверхности материалов только в перчатках. При использовании образцов и наборов часто меняйте перчатки и тщательно мойте руки после работы.
- Перед началом работы осмотрите кассеты с реагентами и убедитесь в отсутствии признаков утечки. Не используйте поврежденную кассету для выделения нуклеиновых кислот.
- При работе следует рассматривать образцы, а также все реагенты и материалы, которые соприкасались с образцами, как потенциально инфекционные и/или биологически опасные материалы; обращайтесь с ними в соответствии с местными нормативными актами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ)

- Набор для экстракции нуклеиновых кислот.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ)

- Полностью автоматическая система очистки нуклеиновых кислот: Molecision MP-32 или Molecision MP-96.
- Стандартное лабораторное оборудование: центрифуга для пробирок и т.д.
- Расходные материалы без следов РНКаз / ДНКаз: пробирки объемом 1,5 мл или 2 мл, пипетки, наконечники для пипеток с аэрозольным фильтром и одноразовые латексные или виниловые перчатки.
- Отдельно заказываемая большая упаковка 8-канальных наконечников (номер по каталогу: 132131002H) и 96-луночный планшет с глубокими ячейками (номер по каталогу: 132131003H).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты

- Компоненты в герметичной упаковке сохраняют стабильность при температуре 2–8 °C до истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Набор нельзя замораживать.
- Реагенты, которые не могут быть использованы полностью, следует поместить в пробирки, не содержащие РНКаз / ДНКаз, плотно закупорить и хранить при температуре 2–8 °C не дольше 3 месяцев.
- Не подвергать воздействию прямых солнечных лучей и магнитов.

Материалы образца

- Для экстракции рекомендуется использовать свежие образцы материалов, срок хранения которых при температуре 2–8 °C не превышает 24 часов. В иных случаях придерживайтесь следующих рекомендаций. Храните образцы материалов не дольше 6 месяцев при –20 ± 5 °C или одного года при –70 ± 5 °C.
- Плазма или кровь не содержат гепарин, поскольку в дальнейшем он может негативно повлиять на эффективность ПЦР.

Очищенные нуклеиновые кислоты

- Очищенные нуклеиновые кислоты следует использовать немедленно для чувствительного определения или хранить при 2–8 °C не более 24 часов, при –20 ± 5 °C не более 7 дней либо при –70 ± 5 °C не более 6 месяцев.
- При замораживании нуклеиновых кислот рекомендовано отдельное хранение аликвот для сокращения количества циклов повторного замораживания и размораживания.

ПРОЦЕДУРА ЛАБОРАТОРНО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

- **Подготовка материалов образца**

Материалы образца	Метод обработки
Цельная кровь, плазма, сыворотка	Подготовьте 300 мкл свежего или замороженного образца, не подвергая его предварительной обработке. Материал образца должен быть полностью однородным (не содержать сгустков в сыворотке, антикоагулированной плазме и цельной крови).
Раствор для консервации образца	Подготовьте 300 мкл образца, встряхните на вортексе в течение 1 минуты.
Свежезамороженная ткань	Добавьте к каждому образцу 300 мкл фосфатно-солевого буфера (1 × ФСБ) при тщательном перемешивании встряхиванием.
Клеточные культуры	Центрифугируйте соответствующий объем образца при 300 × g в течение 5 минут для осаждения клеток. Полностью удалите надосадочную жидкость и повторно суспендируйте осадок клеток в 300 мкл 1 × ФСБ.

При недостаточном количестве образца добавьте к нему соответствующий объем 1 × ФСБ, чтобы общий объем составлял 300 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество культивированных клеток не должно превышать 5×10^6 клеток/300 мкл, их избыток может снизить эффективность экстракции.

- **Подготовка реагента**

Извлеките планшет для реагентов и оставьте при комнатной температуре до устранения разницы температур. Переверните планшет три раза, снимите пластиковую пленку и недолго центрифугируйте в центрифуге для 96-луночного планшета (или встряхните его вручную), чтобы жидкость не оставалась на стенках или алюминиевой фольге. Оторвите алюминиевую фольгу на планшете для реагентов и разместите планшет в правильном направлении (магнитные частицы в колонке 6/12).

- **Добавление образца**

Добавьте 300 мкл жидкого образца и 10 мкл протеиназы K в первую и седьмую колонки планшета для реагентов. Будьте осторожны, чтобы не допустить перекрестного загрязнения образцов.

При необходимости смешивания внутреннего контрольного образца (ВК) с образцом помните, что общий объем этих компонентов не может превышать 300 мкл.

- **Загрузка планшета для реагентов**

Загрузите планшет для реагентов в полностью автоматическую систему очистки нуклеиновых кислот. Установите два 8-канальных наконечника на один планшет. В систему Molecision MP-32 можно одновременно установить до четырех 8-канальных наконечников и два планшета, в систему Molecision MP-96 можно одновременно установить до 12 8-канальных наконечников и шесть планшетов.

- **Настройка программы**

Настройте процедуры экстракции на приборе согласно приведенной таблице или используйте сканер, чтобы отсканировать QR-код на этикетке набора для автоматического выполнения процедур экстракции и сохранения данных процедур в качестве шаблона для последующего использования.

Этап	Полож. отвер.	ИД назв. шага	Вр. ожид. (мин:с)	Время перемешивания (мин:с)	Вр. магн. (мин:с)	Реж. адсорб.	Реж. смеш.	Объем (мкл)
1	1/7	Лизис	00:00	10:00	00:00	Норм.	Высокая скорость	800
2	6/12	Частицы	00:00	00:15	00:30	Интенсив.	Средняя скорость	150
3	1/7	Связывание	00:00	10:00	00:35	Интенсив.	Средняя скорость	800
4	2/8	Промывка 1	00:00	02:00	00:30	Интенсив.	Низкая скорость	600
5	3/9	Промывка 2	00:00	01:00	00:30	Интенсив.	Низкая скорость	600
6	4/10	Промывка 3	00:00	01:00	00:30	Интенсив.	Низкая скорость	600
7	5/11	Элюция	02:00	05:00	00:35	Норм.	Высокая скорость	80
8	6/12	Утилизация	00:00	00:30	00:00	Норм.	Высокая скорость	150

Температура лизиса составляет 75 °C, непрерывное нагревание прекращается на этапе 2.

Температура элюирования составляет 75 °C, непрерывное нагревание начинается на этапе 7.

- **Хранение нуклеиновых кислот**

После автоматического завершения работы программы перенесите нуклеиновую кислоту из лунки в положении 5/11 в пробирки без следов РНКаз / ДНКаз. Нуклеиновая кислота, которая не будет использоваться сразу, должна помещаться на хранение в соответствии с указаниями в разделе «ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ», подраздел «Очищенные нуклеиновые кислоты».

Контроль качества

В случае последующего применения в протокол экстракции необходимо добавить внутренний контроль.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Набор прошел валидацию только с материалами образцов, указанными в разделе «МАТЕРИАЛЫ ОБРАЗЦА».
- К работе с этим набором должен допускаться только персонал, прошедший обучение методам молекулярной диагностики.
- Несоблюдение условий хранения (температура, продолжительность) компонентов набора или недостаточное количество микроорганизмов в материалах образцов может привести к получению ложноотрицательных результатов.
- Достоверность полученных результатов зависит от соблюдения процедур взятия, транспортировки, хранения и подготовки образцов, а также от других факторов, влияние которых не оценивалось.
- Достоверность результатов также зависит от оборудования для анализа нуклеиновых кислот, которое будет использоваться в дальнейшем. Любое диагностическое in vitro исследование с использованием процедуры подготовки образца в сочетании с последующим тестированием нуклеиновой кислоты для целей диагностики in vitro должно быть валидировано с учетом индивидуальных параметров такой диагностики, и интерпретация любого полученного результата должна осуществляться в контексте всех соответствующих клинических и лабораторных данных.
- Чтобы максимально снизить риск получения недостоверных результатов, для последующих исследований должны использоваться соответствующие контрольные образцы.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики

Количественную ПЦР / ОТ-ПЦР выполняли на оборудовании LineGene 9600 компании Bioer с использованием 20 мкл элюата в общем объеме реакционной смеси ПЦР 50 мкл. Контрольные образцы для количественной оценки добавляли непосредственно перед началом ПЦР.

Тип образца	Предел обнаружения
Раствор для консервации образца мазка из ротоглотки (вирус SARS-CoV-2)	120 копий/мл
Плазма (вирус гепатита B)	5 МЕ/мл

Прецизионность анализа

Для определения прецизионности в пределах одного анализа все данные были получены за один рабочий цикл. Для установления прецизионности в серии анализов разные операторы на разном оборудовании в разных лабораториях выполнили три рабочих цикла. Прецизионность от партии к партии определялась с использованием трех отдельных партий.

Тип образца	Прецизионность в пределах одного анализа	Прецизионность в серии анализов
Раствор для консервации образца мазка из ротоглотки (вирус SARS-CoV-2)	≤ 3 %	≤5 %.
Плазма (вирус гепатита B)	≤ 3 %	≤5 %.

Эффективность очистки

Для установления прецизионности эффективности очистки геномную ДНК выделяли из цельной крови. Выход и чистоту выделенной нуклеиновой кислоты определяли измерением оптической плотности (OD). Ниже представлены условия эксперимента и полученные результаты.

Тип образца	Объем (мкл)	Выход (мкг)	Чистота	
			OD260/280	OD260/230
Цельная кровь ($2{,}3 \times 10^3$ лимфоцитов/мл)	100 200 300	1,1~1,3 2,0~2,1 2,7~3,0	1,8~2,0 1,8~2,1 1,9~ 2,0	1,5~1,7 1,5~1,7 1,6~1,8
Клеточные культуры ($5{,}4 \times 10^6$ клеток/мл)	30 300	8,6~9,2 24,3~27,6	1,8~2,1 1,9~2,1	1,5~1,8 1,6~1,8

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alfredo Ribeiro-Silva, et al. RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies. BMC Mol Biol . 2007,8:118.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Molecision™ является товарным знаком компании Snibe. Все прочие названия продуктов и товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ

	См. инструкцию по использованию		Производитель
	Допустимый температурный диапазон (хранить при температуре 2–8 °C)		Срок годности
	Содержимого достаточно для проведения <n> анализов		Беречь от воздействия солнечных лучей
	Этой стороной вверх	LOT	Код партии
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*	EC REP	Официальный представитель в Европейском сообществе
REF	Номер по каталогу	CE	Маркировка CE

Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.
No.23, Jinxiu East Road, Pingshan District, 518122 Shenzhen, P.R. China
Тел.: +86-755-21536601 Факс: +86-755-28292740

EC REP **Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)**
Eiffestrasse 80, 20537 Hamburg, Germany
Тел.: +49-40-251-31-75 Факс: +49-40-255726

КОПИЯ ВЕРНА
Теличко Д.О.
на основании доверенности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru