



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест COVID-19» (кат. № K19M)

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для выявления РНК коронавируса COVID-19 методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» содержит все необходимые компоненты (включая контроли) для проведения реакции амплификации и не требует дополнительных реагентов.

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительной тест-системой для выявления РНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов в реакции ОТ-ПЦР или 500 копий / мл образца.

Тест-система «АртТест COVID-19» обладает высокой диагностической устойчивостью к мутациям вируса за счет использования 2 различных мишеней в геноме вируса: ORF1ab и ген N.

Тест-система «АртТест COVID-19» прошла клинические испытания, по результатам которых чувствительность составляет более 98,6%, специфичность – 100%.

Тест-система «АртТест COVID-19» не обладает кросс-реактивностью к Influenza A virus, Influenza B virus, Human coronavirus HKU-1, Human coronavirus NL-63, Human rhinovirus, ДНК *Mycoplasma pneumonia*, *Streptococcus pneumonia*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, а также к нормальной микрофлоре полости носа и ротоглотки человека и ДНК человека в концентрации до 10^9 копий/мл образца.

В тест-системе «АртТест COVID-19» значительно снижен риск ошибки оператора на всех этапах работы за счет использования идентичных и простых протоколов тест-систем серии «АртТест».

Тест-система «АртТест COVID-19» совместима со многими амплификаторами открытого типа с детекцией результатов в режиме реального времени: Mx 3005P™ QPCR System (Agilent), Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific), 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™), «ДТ-96» (ДНК-Технологии) и др.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 80–90 мин получить достоверные результаты исследования, что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Тест-системы «АртТест COVID-19» с эндогенным ВКО позволяет проводить анализ качества забора биологического материала.

Комплектация тест-системы «АртТест COVID-19» с эндогенным ВКО рассчитана на проведение 100 реакций и указана в таблица 1.

Таблица 1. Состав тест-системы «АртТест COVID-19» с эндогенным ВКО

Компонент	Объем, не менее
1. ОТ-ПЦР-реагент	1 пробирка – 0,5 мл
2. Праймеры COVID-19	1 пробирка – 1,0 мл
3. ПКО	1 пробирка – 0,2 мл
4. ОКО	1 пробирка – 1,0 мл

Для этапа экстракции РНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртРНК экстракт», «АртРНК магнит» или «АртРНК Магнит».

Результат амплификации РНК возбудителя регистрируется на каналах HEX/Yellow/VIC и ROX/Orange, результат амплификации внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
- ПЦР-бокс;
- центрифуга/вортекс;
- набор дозаторов переменного объема;

- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл;
- оптические пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение РНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя реагентов для очистки РНК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5-2 мл приготовить «Мастер Микс»:

5*(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

II. Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

III. В подготовленные пробирки добавить по 10 мкл РНК исследуемых образцов.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

- 1) К- – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ;
- 2) К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКЭ;
- 3) ОКЭ – внести в пробирку 10 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации на приборах CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), «ДТ-96» (ДНК-Технологии)

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), «ДТ-96» (ДНК-Технологии)

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM, HEX, ROX	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

IV. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Постановка реакции амплификации на приборах Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
- Выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции».
- Для всех каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl;
- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 3.

Таблица 3. Параметры амплификации Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: Green, Yellow, Orange	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

V. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

VI. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Постановка реакции амплификации QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific)

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
- Выбрать Name: ввести уникальное название протокола,
- Выбрать Instrument type: QuantStudio™ 5 System,
- Выбрать Block type: 96-Well 0.2-mL Block или 96-Well 0.1-mL Block (в зависимости от модели прибора),
- Выбрать Experiment type: Standard Curve,
- Выбрать Chemistry: TaqMan™ Reagents, Run Mode: Standard;
- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 4.

Таблица 4. Параметры амплификации QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific)

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM, VIC, ROX	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

VIII. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

IX. Убрать наличие пассивного контроля в эксперименте.

X. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Постановка реакции амплификации 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™)

- I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
- II. Выбрать: Assay: Standard Curve (Absolute Quantitation)
- III. Выбрать: Run mode: Standard 7500
- IV. Выбрать: Passive reference: None, Sample volume: 25 µL;
- V. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 5.

Таблица 5. Параметры амплификации 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™)

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM, VIC, ROX	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

VI. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

VII. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene»:

- установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 5%;
- установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,05;
- при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Kор-рек. Уклона».

б) для приборов плащечного типа:

- установить значение параметра пороговой линии около 5 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

** в зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow/VIC	Значение «Ct» по каналу ROX/Orange
ОКЭ	Экстракция РНК	не анализируется	–	–
К-	ПЦР	–	+	+
К+	ПЦР	+	+	+

В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов начиная со стадии экстракции РНК.

В случае несоответствия контрольных точек К- и К+ необходимо провести повторное исследование всех

образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Таблица интерпретации результатов образцов

Результат образца	Значение «Сb» по каналу FAM/Green	Значение «Сb» по каналу HEX/Yellow/VIC	Значение «Сt» по каналу ROX/Orange
Положительный	+/-	+	–
Положительный	+/-	–	+
Положительный	+/-	+	+
Отрицательный	+	–	–
Не валидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Сb», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Сb», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение «Сb» для данного канала не анализируется

В случае не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца начиная с этапа экстракции РНК или со стадии забора материала у пациента.

Повторный не валидный результат свидетельствует о некачественном отборе клинического материала и требует перепостановки начиная с этапа отбора клинического материала.

В случае сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах – данные пробы не интерпретируются и подлежат повторному анализу с этапа экстракции РНК.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Транспортировка тест-системы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре +2–8 °С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Тест-систему хранят в упаковке изготовителя при температуре от –24 °С до –16 °С.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест COVID-19» – 12 месяцев с даты изготовления.

ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Использование неподходящих расходных материалов	используйте оптические пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некачественно отобранный клинический материал	провести повторный забор клинического материала
	ПЦР ингибирование	разведите образец в 5 раз в воде, свободной от РНКаз и повторите анализ.
		используйте новый образец материала используйте другой метод выделения РНК
Нет сигнала в K+	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по каналу HEX/Yellow/VIC или ROX/Orange в K-и/или ОКЭ	Контаминация	- проведите деконтаминационные процедуры; - используйте новые наборы

Примечания:

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Транспортировка тест-системы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре +2–8 °С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Тест-систему хранят в упаковке изготовителя при температуре от –24 °С до –16 °С.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест COVID-19» – 12 месяцев с даты изготовления.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Клинические характеристики набора для обнаружения ПЦР в реальном времени «АртТест COVID-19» были протестированы с использованием 384 образцов нуклеиновых кислот, выделенных из положительных мазков из носоглотки, собранных в универсальной вирусной транспортной системе BD™ от пациентов с клиническим подозрением на COVID-19. Было обнаружено 276 положительных образца SARS-CoV-2, и эти результаты согласуются с клиническими данными, полученными в лабораториях Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Государственного учреждения «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Учреждения здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» с тестами, разработанным в соответствии с праймерами CDC и зондами для обнаружения 2019-nCoV. Результаты были следующими:

АртТест COVID-19	Данные испытательных лабораторий					
		PA	PD	NA	ND	Всего
	N+	276	0			276
	N-	4		104	4	108
	Всего	280		104		384

Показатели относительной диагностической точности (AC), относительной диагностической чувствительности (SE), относительной диагностической специфичности (SP) рассчитываются по следующим формулам:

$$AC = (PA + NA) / N * 100\%$$

$$SP = (NA / N-) * 100\%$$

$$SE = (PA / N+) * 100\%$$

Согласно полученным в испытательных лабораториях данным расчётные показатели были следующими:

Относительная диагностическая точность: 99,0%

Относительная диагностическая чувствительность: 98,6%

Относительной диагностическая специфичности: 100,0%

СИМВОЛЫ КОМПОНЕНТОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

	Изделие мед назначения для диагностики in vitro
	Рассчитано на «N» исследований
	Согласно инструкции по применению
	Температурный режим
	Каталожный номер
	Дата изготовления
	Срок годности
	Номер серии
	производство
	Авторизовано в ЕС