

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ Тест-системы «АртТест COVID-19»

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) в биологическом материале (назофарингеальные и орофарингеальные мазки) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительной тест-системой для выявления нуклеиновых кислот (НК). Тест-система способна выявлять выделенные НК патогена независимо от исходного типа биологического (клинического) материала.

Аналитическая чувствительность тест-системы «АртТест COVID-19» составляет 100% (при тестировании панели стандартных контрольных образцов предприятия).

Аналитическая специфичность тест-системы «АртТест COVID-19» составляет 100% (при тестировании панели стандартных контрольных образцов предприятия).

Аналитическая специфичность тест-системы проанализирована *in silico* на специфичность ко всем организмам доменов *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya* (*Eukaryota*), надцарства *Viruses*. Аналитическую специфичность выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 определяли при тестировании панели образцов, содержащих НК человека, микроорганизмов, вирусов, в том числе HCV, HBV, HIV-1, HAV, CMV, EBV, HHV-6, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 45, HPV 58, B19, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Ureaplasma urealiticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*. Перекрестных реакций не выявлено.

Повторяемость: коэффициент вариации менее 5%.

Воспроизводимость: коэффициент вариации менее 10%.

Тест-систем «АртТест COVID-19» разработана с учетом рекомендаций WHO и FDA.

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.

В тест-системе «АртТест COVID-19» универсальный протокол амплификации для тест-систем серии «АртТест», который позволяет за 70 – 90 минут получить достоверные результаты исследования с минимальными рисками ошибки оператора, что существенно повышает точность лабораторных анализов.

Тест-система выпускается в различных комплектациях: для качественного определения с экзогенным ВКО (комплектации 1, 11), для качественного определения с эндогенным ВКО (комплектации 2, 12), для определения без стадии экстракции НК (комплектации 3, 13), дополнительно укомплектованные расходным материалом для ПЦР (комплектации 11, 12, 13). Все реагенты тест-системы расфасованы в пробирки 1,5 – 2 мл, пригодные для центрифугирования. Тест-система содержит полный комплект готовых к использованию реагентов для проведения ПЦР-исследований.

Комплектации тест-системы «АртТест COVID-19» указаны в таблице 1 и рассчитаны на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Комплектации «АртТест COVID-19»

Комплектация	Состав
Комплектация 1	– ОТ-ПЦР-реагент – 0,5 мл; – Праймеры COVID-19 – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – ВКО – 1,0 мл.
Комплектация 2	– ОТ-ПЦР-реагент – 0,5 мл; – Праймеры COVID-19 – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл.
Комплектация 3	– ОТ-ПЦР-реагент – 0,5 мл; – Праймеры COVID-19 – 1,5 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл.
Комплектация 11	– ОТ-ПЦР-реагент – 0,5 мл; – Праймеры COVID-19 – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – ВКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.
Комплектация 12	– ОТ-ПЦР-реагент – 0,5 мл; – Праймеры COVID-19 – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.
Комплектация 13	– ОТ-ПЦР-реагент – 0,5 мл; – Праймеры COVID-19 – 1,5 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртНК Магнит», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени». Тест-система совместима со всеми амплификаторами открытого типа в том числе: Bio-Rad CFX96/Opus/Connect (Bio-Rad Laboratories, Inc.), ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт (ООО «НПО ДНК-Технология»), Rotor-Gene 3000/6000/Q (QIAGEN GmbH), LineGene 9600/9660, QuantGene 9600 (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd), Gentier 96E/96R (Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd), QuantStudio™ 3/5 (Thermo Fisher Scientific), 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™), Mx 3005P™ QPCR System (Agilent);

- 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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;

- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ проводится в соответствии с Методическими указаниями к каждой комплектации, утвержденными в установленном порядке, согласно перечню:

Приложение А - Методические указания по применению тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 1;

Приложение Б - Методические указания по применению тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 2;

Приложение В - Методические указания по применению тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 3;

Приложение Г - Методические указания по применению тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 11;

Приложение Д - Методические указания по применению тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 12;

Приложение Е - Методические указания по применению тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 13.

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.

При получении разукomплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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 или значение Ct>29	Некорректный забор биологического материала	повторить забор клинического материала
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК из клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем растворе, повторить анализ использовать новый образец материала использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в K+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2 Методических указаний
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в K- по каналу FAM/Green и/или HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы
Наличие сигнала в ОКЭ по каналу HEX/VIC/Yellow		

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тест-система предназначена для профессионального применения и должна использоваться только квалифицированным персоналом.

Информация, указанная в инструкции к тест-системе, распространяется на все комплектации, если иное не отмечено в индивидуальном порядке. Детальная информация по процедуре проведения ПЦР в зависимости от комплектации изделия и типа используемого оборудования изложена в Методических указаниях по применению каждой комплектации тест-системы. Применять набор строго в соответствии с Методическими указаниями, соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики.

Заявленные производителем характеристики тест-системы гарантируются только при использовании пробирок, предназначенных для постановки ПЦР в реальном времени, рекомендованных или адаптированных производителем для данной модели амплификатора.

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации и обязуется заменить изделие, если выявленное несоответствие технических и функциональных характеристик явилось следствием скрытого дефекта используемых материалов или некачественного изготовления изделия производителем. По всем возникающим вопросам следует обращаться по телефонам и электронной почте, указанным на упаковке тест-системы.

Безопасность и качество тест-системы гарантируются в течение всего срока годности.

Тест-система не содержит инфекционных агентов, ЛВЖ, летучих и токсичных веществ, а также веществ с канцерогенным, мутагенным и тератогенным действием.

Не применять тест-систему после окончания срока годности.

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковка относятся отходам классов А1 и Г, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с Постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14. При утилизации ПЦР-пробирок, содержащих продукты амплификации, недопустимо автоклавирувание, открывание пробирок.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест COVID-19»

Комплектация 1

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для определения нуклеиновых кислот (НК) коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

Комплектация 1 используется для качественного определения возбудителя. В состав комплектации входит экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО) для оценки эффективности выделения НК и наличия ингибиторов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ¹

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительным набором для выявления НК.

Аналитическая чувствительность – 100%. Аналитическая специфичность – 100%.

Тест-система «АртТест COVID-19» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает точность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Состав «АртТест COVID-19»

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

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов «АртНК Магнит», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации экзогенного ВКО регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение НК из клинического материала производится совместно с ВКО в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя реагентов для очистки НК. Внутренний контрольный образец вносится при выделении в каждый исследуемый и контрольный образцы.

На стадии выделения нуклеиновых кислот обязательна постановка одного контрольного образца - отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. Каждая постановка амплификации, помимо исследуемых образцов, должна включать 3 контрольных образца:

- контрольный образец этапа выделения (ОКЭ);
- отрицательный контроль ПЦР (К-);
- положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить ПЦР-смесь:

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

Где N – общее количество реакций амплификации, включая исследуемые образцы и 3 контрольных образца.

II. Перемешать ПЦР-смесь путем 5-ти кратного переворачивания (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Неиспользованные остатки ПЦР-смеси хранению не подлежат.

III. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенных НК исследуемых образцов.

IV. Внести контрольные образцы:

- 1) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ;
- 2) К-: 10 мкл ОКЭ;
- 3) К+: 10 мкл ПКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

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

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/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время прохождения амплификации или после окончания, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

* Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q» перед запуском 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 лунке 1 должна стоять пробирка с ПКЭ, в случае одновременной постановки нескольких тест-

систем, пробирка с ПКО тест-системы, содержащей наибольшее количество анализируемых флуорофоров.

Для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт» установить экспозицию измерений для анализируемых каналов – 1000; при необходимости (смена типа, производителя пробирок/стрипов/плашетов) измерить высоту пробирок согласно инструкции к прибору.

Анализ результатов

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

а) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus/Connect»*:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

– активировать функции «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

б) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

в) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2;

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %;

– активировать функции «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5», «Line-Gene 9600/9660», «QuantGene 9600», «Gentier 96E», «Gentier 96R», «7500 Real-Time PCR Systems», «Mx 3005P™ QPCR System» и для других амплификаторов открытого типа:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

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

II. Для оценки корректности установки пороговой линии выбрать логарифмическую шкалу для отображения 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	HEX/VIC/Yellow
ОКЭ	Экстракция НК	+	–
К-	ОТ-ПЦР	–	–
К+	ОТ-ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии **Выделения НК**.

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

Таблица 4. Оценка результата анализа клинических образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу	
	FAM/Green	HEX/VIC/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	<29	33 – 35
Отрицательный	<29	> 35 или отсутствует
Невалидный	≥29/-	–

«-» обозначает отсутствие значения Ct, кривая амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения Ct, кривая амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение Ct для данного канала не учитывается

Рекомендуемый алгоритм оценки результата анализа клинических образцов (в случае соответствия контрольных точек требуемым значениям):

- проанализировать образцы по каналам возбудителя (HEX/VIC/Yellow), для положительных выдать заключение;
- проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;
- оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести анализ соответствующего клинического образца, начиная со стадии **Выделения НК**.

Если для ОКЭ и/или К- зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, образцы этой постановки, интерпретированные как отрицательные, следует учитывать как отрицательные; анализ образцов этой постановки, в которых зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, необходимо повторить, начиная со стадии **Выделения НК**.

При получении валидного результата отсутствие значения порогового цикла Ct по каналу HEX/VIC/Yellow свидетельствует о том, что результат менее предела обнаружения тест-системы.

Результат ПЦР-анализа учитывается при комплексной диагностике заболевания.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °C до -16 °C. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °C (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green или значение Ct>29	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК из клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в K+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в K- по каналу FAM/Green и/или HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы
Наличие сигнала в ОКЭ по каналу HEX/VIC/Yellow		

¹ Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест COVID-19»

Комплектация 2

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для определения нуклеиновых кислот (НК) коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

Комплектация 2 используется для качественного определения возбудителя. В состав комплектации входит эндогенный внутренний контроль для контроля этапа забора образца и выделения НК.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ¹

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительным набором для выявления НК.

Аналитическая чувствительность – 100%. Аналитическая специфичность – 100%.

Тест-система «АртТест COVID-19» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Состав «АртТест COVID-19»

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

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов «АртНК Магнит», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

На стадии выделения нуклеиновых кислот обязательна постановка одного контрольного образца - отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. Каждая постановка амплификации, помимо исследуемых образцов, должна включать 3 контрольных образца:

- контрольный образец этапа выделения (ОКЭ);
- отрицательный контроль ПЦР (К-);
- положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить ПЦР-смесь:

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

Где N – общее количество реакций амплификации, включая исследуемые образцы и 3 контрольных образца.

II. Перемешать ПЦР-смесь путем 5-ти кратного переворачивания (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Неиспользованные остатки ПЦР-смеси хранению не подлежат.

III. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенных НК исследуемых образцов.

IV. Внести контрольные образцы:

- 1) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ;
- 2) К-: 10 мкл ОКЭ;
- 3) К+: 10 мкл ПКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

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

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/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время прохождения амплификации или после окончания, 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*.

* Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q» перед запуском 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 лунке 1 должна стоять пробирка с ПКЭ, в случае одновременной постановки нескольких тест-

систем, пробирка с ПКО тест-системы, содержащей наибольшее количество анализируемых флуорофоров.

Для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт» установить экспозицию измерений для анализируемых каналов – 1000; при необходимости (смена типа, производителя пробирок/стрипов/плашетов) измерить высоту пробирок согласно инструкции к прибору.

Анализ результатов

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

а) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus/Connect»*:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

– активировать функции «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

б) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

в) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2;

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %;

– активировать функции «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5», «Line-Gene 9600/9660», «QuantGene 9600», «Gentier 96E», «Gentier 96R», «7500 Real-Time PCR Systems», «Mx 3005P™ QPCR System» и для других амплификаторов открытого типа:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации.

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

II. Для оценки корректности установки пороговой линии выбрать логарифмическую шкалу для отображения 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	HEX/VIC/Yellow
ОКЭ	Экстракция НК	+/-	–
К-	ОТ-ПЦР	–	–
К+	ОТ-ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции НК.

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

Таблица 4. Оценка результата анализа клинических образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу	
	FAM/Green	HEX/VIC/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	<29	33 – 35
Отрицательный	<29	> 35 или отсутствует
Невалидный	≥29/-	–

«–» обозначает отсутствие значения Ct, кривая амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения Ct, кривая амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение Ct для данного канала не учитывается

Рекомендуемый алгоритм оценки результата анализа клинических образцов (в случае соответствия контрольных точек требуемым значениям):

а) проанализировать образцы по каналам возбудителя (HEX/VIC/Yellow), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести анализ соответствующего клинического образца, начиная со стадии **Выделения НК**.

Если для ОКЭ и/или К- зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, образцы этой постановки, интерпретированные как отрицательные, следует учитывать как отрицательные; анализ образцов этой постановки, в которых зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, необходимо повторить, начиная со стадии **Выделения НК**.

При получении валидного результата отсутствие значения порогового цикла Ct по каналу HEX/VIC/Yellow свидетельствует о том, что результат менее предела обнаружения тест-системы.

Результат ПЦР-анализа учитывается при комплексной диагностике заболевания.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °C до -16 °C. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °C (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green или значение Ct>29	Некорректный забор биологического материала	повторить забор клинического образца
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК из клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в ОКЭ по каналу HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы

¹ Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

ПРИЛОЖЕНИЕ В

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 3

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для определения нуклеиновых кислот (НК) коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

Комплектация 3 используется для качественного определения возбудителя без стадии экстракции НК.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ¹

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительным набором для выявления НК.

Аналитическая чувствительность – 100%. Аналитическая специфичность – 100%.

Тест-система содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает точность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Состав «АртТест COVID-19»

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

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В качестве клинического материала используются мазки из носоглотки и ротоглотки, помещенные в физраствор или PBS. Отбор образцов производится в соответствии с существующими ТНПА. Перед отбором мазков не допускается проведение гигиенических процедур носоглотки и ротоглотки (в том числе чистка зубов, полоскание и т.п.), а также обработка медицинскими препаратами. Не допускается замораживание образцов. Перед постановкой ПЦР образцы необходимо встряхнуть.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. Каждая постановка амплификации, помимо исследуемых образцов, должна включать 2 контрольных образца:

- отрицательный контроль ПЦР (К-);
- положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить ПЦР-смесь:

5*(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента + 15*(N+1) мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации, включая исследуемые образцы и 2 контрольных образца.

II. Перемешать ПЦР-смесь путем 5-ти кратного переворачивания (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Неиспользованные остатки ПЦР-смеси хранению не подлежат.

III. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 5 мкл исследуемых образцов.

IV. Внести контрольные образцы:

- 1) К-: 5 мкл ОКО;
- 2) К+: 5 мкл ПКО.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуются перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

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

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	2 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/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время прохождения амплификации или после окончания, 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*.

* Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q» перед запуском 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» – 5FI и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10FI. В лунке 1 должна стоять пробирка с ПКО, в случае одновременной постановки нескольких тест-систем, пробирка с ПКО тест-системы, содержащей наибольшее количество анализируемых флуорофоров.

Для приборов «dT-96/дТпрайм/дТлайт» установить экспозицию измерений для анализируемых каналов – 1000; при необходимости (смена типа, производителя пробирок/стрипов/планшетов) измерить высоту пробирок согласно инструкции к прибору.

Анализ результатов

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

а) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus/Connect»*:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае

некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

– активировать функции «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

б) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

в) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2;

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %;

– активировать функции «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5», «Line-Gene 9600/9660», «QuantGene 9600», «Gentier 96E», «Gentier 96R», «7500 Real-Time PCR Systems», «Mx 3005P™ QPCR System» и для других амплификаторов открытого типа:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации.

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

II. Для оценки корректности установки пороговой линии выбрать логарифмическую шкалу для отображения 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	HEX/VIC/Yellow
К-	ОТ-ПЦР	+/-	–
К+	ОТ-ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек К- и К+ необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

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

Таблица 4. Оценка результата анализа клинических образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу	
	FAM/Green	HEX/ VIC/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	<29	33–35
Отрицательный	<29	> 35 или отсутствует
Невалидный	≥29/-	–

«–» обозначает отсутствие значения Ct, кривая амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения Ct, кривая амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение Ct для данного канала не учитывается

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца.

Если в постановке для ОКЭ и/или К- зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, образцы, интерпретированные как отрицательные, следует учитывать как отрицательные; анализ остальных образцов необходимо повторить.

При получении валидного результата отсутствие значения порогового цикла Ct по каналам HEX/VIC/Yellow свидетельствует о том, что результат менее предела обнаружения.

Результат ПЦР-анализа учитывается при комплексной диагностике заболевания.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24°C до -16°C. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °C (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green или значение Ct>29	Некорректный забор биологического материала	повторить забор клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать другие зонды для отбора материала
		использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторите анализ
		использовать новый образец материала провести этап выделения НК для образца
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в К- по каналу HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры использовать новые наборы

¹ Более полное описание характеристики тест-системы представлено в инструкции по применению

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест COVID-19»

Комплектация 11

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для определения нуклеиновых кислот (НК) коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

Комплектация 11 используется для качественного определения возбудителя. В состав комплектации входит экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО) для оценки эффективности выделения НК и наличия ингибиторов, а также расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ¹

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительным набором для выявления НК.

Аналитическая чувствительность – 100%. Аналитическая специфичность – 100%.

Тест-система «АртТест COVID-19» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает точность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Состав «АртТест COVID-19»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ОТ-ПЦР-реагент	0,5 мл
2. Праймеры COVID-19	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
5. ВКО	1,0 мл
Комплект пластика (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов «АртНК Магнит», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации экзогенного ВКО регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;

– комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение НК из клинического материала производится совместно с ВКО в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя реагентов для очистки НК. Внутренний контрольный образец вносится при выделении в каждый исследуемый и контрольный образцы.

На стадии выделения нуклеиновых кислот обязательна постановка одного контрольного образца - отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. Каждая постановка амплификации, помимо исследуемых образцов, должна включать 3 контрольных образца:

- контрольный образец этапа выделения (ОКЭ);
- отрицательный контроль ПЦР (К-);
- положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить ПЦР-смесь:

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

Где N – общее количество реакций амплификации, включая исследуемые образцы и 3 контрольных образца.

II. Перемешать ПЦР-смесь путем 5-ти кратного переворачивания (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Неиспользованные остатки ПЦР-смеси хранению не подлежат.

III. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенных НК исследуемых образцов.

IV. Внести контрольные образцы:

- 1) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ;
- 2) К-: 10 мкл ОКО;
- 3) К+: 10 мкл ПКО.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуются перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

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

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/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время прохождения амплификации или после окончания, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

* Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q» перед запуском 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» – 5FI и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10FI. В лунке 1 должна стоять пробирка с ПКО, в случае одновременной постановки нескольких тест-систем, пробирка с ПКО тест-системы, содержащей наибольшее количество анализируемых флуорофоров.

Для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт» установить экспозицию измерений для анализируемых каналов – 1000; при необходимости (смена типа, производителя пробирок/стрипов/плашетов) измерить высоту пробирок согласно инструкции к прибору.

Анализ результатов

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

а) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus/Connect»*:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

– активировать функции «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

б) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

в) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2;

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %;

– активировать функции «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5», «Line-Gene 9600/9660», «QuantGene 9600», «Gentier 96E», «Gentier 96R», «7500 Real-Time PCR Systems», «Mx 3005P™ QPCR System» и для других амплификаторов открытого типа:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

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

II. Для оценки корректности установки пороговой линии выбрать логарифмическую шкалу для отображения 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	HEX/VIC/Yellow
ОКЭ	Экстракция НК	+	–
К-	ОТ-ПЦР	–	–
К+	ОТ-ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии **Выделения НК**.

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

Таблица 4. Оценка результата анализа клинических образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу	
	FAM/Green	HEX/VIC/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	<29	33 – 35
Отрицательный	<29	> 35 или отсутствует
Невалидный	≥29/-	–

«–» обозначает отсутствие значения Ct, кривая амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения Ct, кривая амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение Ct для данного канала не учитывается

Рекомендуемый алгоритм оценки результата анализа клинических образцов (в случае соответствия контрольных точек требуемым значениям):

- проанализировать образцы по каналам возбудителя (HEX/VIC/Yellow), для положительных выдать заключение;
- проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;
- оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести анализ соответствующего клинического образца, начиная со стадии **Выделения НК**.

Если для ОКЭ и/или К- зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, образцы этой постановки, интерпретированные как отрицательные, следует учитывать как отрицательные; анализ образцов этой постановки, в которых зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, необходимо повторить, начиная со стадии **Выделения НК**.

При получении валидного результата отсутствие значения порогового цикла Ct по каналу HEX/VIC/Yellow свидетельствует о том, что результат менее предела обнаружения тест-системы.

Результат ПЦР-анализа учитывается при комплексной диагностике заболевания.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукomплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °C до -16 °C, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °C (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green или значение Ct>29	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК из клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в K+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в K- по каналу FAM/Green и/или HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы
Наличие сигнала в ОКЭ по каналу HEX/VIC/Yellow		

¹ Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы «АртТест COVID-19»

Комплектация 12

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для определения нуклеиновых кислот (НК) коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

Комплектация 12 используется для качественного определения возбудителя. В состав комплектации входит эндогенный внутренний контроль для контроля этапа забора образца и выделения НК, а также расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ¹

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительным набором для выявления НК.

Аналитическая чувствительность – 100%. Аналитическая специфичность – 100%.

Тест-система «АртТест COVID-19» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает точность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Состав «АртТест COVID-19»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ОТ-ПЦР-реагент	0,5 мл
2. Праймеры COVID-19	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
Комплект пластика (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов «АртНК Магнит», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;

– комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

На стадии выделения нуклеиновых кислот обязательна постановка одного контрольного образца - отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. Каждая постановка амплификации, помимо исследуемых образцов, должна включать 3 контрольных образца:

- контрольный образец этапа выделения (ОКЭ);
- отрицательный контроль ПЦР (К-);
- положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить ПЦР-смесь:

$5 \cdot (N+1)$ мкл ОТ-ПЦР-реагента + $10 \cdot (N+1)$ мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации, включая исследуемые образцы и 3 контрольных образца.

II. Перемешать ПЦР-смесь путем 5-ти кратного переворачивания (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Неиспользованные остатки ПЦР-смеси хранению не подлежат.

III. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенных НК исследуемых образцов.

IV. Внести контрольные образцы:

- 1) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ;
- 2) К-: 10 мкл ОКЭ;
- 3) К+: 10 мкл ПКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

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

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/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время прохождения амплификации или после окончания, 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*.

* Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q» перед запуском 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» – 5FI и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10FI. В лунке 1 должна стоять пробирка с ПКО, в случае одновременной постановки нескольких тест-систем, пробирка с ПКО тест-системы, содержащей наибольшее количество анализируемых флуорофоров.

Для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт» установить экспозицию измерений для анализируемых каналов – 1000; при необходимости (смена типа, производителя пробирок/стрипов/плашетов) измерить высоту пробирок согласно инструкции к прибору.

Анализ результатов

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

а) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus/Connect»*:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

– активировать функции «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

б) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

в) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2;

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %;

– активировать функции «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5», «Line-Gene 9600/9660», «QuantGene 9600», «Gentier 96E», «Gentier 96R», «7500 Real-Time PCR Systems», «Mx 3005P™ QPCR System» и для других амплификаторов открытого типа:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации.

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

II. Для оценки корректности установки пороговой линии выбрать логарифмическую шкалу для отображения 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	HEX/VIC/Yellow
ОКЭ	Экстракция НК	+/-	–
К-	ОТ-ПЦР	–	–
К+	ОТ-ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции НК.

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

Таблица 4. Оценка результата анализа клинических образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу	
	FAM/Green	HEX/VIC/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	<29	33 – 35
Отрицательный	<29	> 35 или отсутствует
Невалидный	≥29/-	–

«–» обозначает отсутствие значения Ct, кривая амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения Ct, кривая амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение Ct для данного канала не учитывается

Рекомендуемый алгоритм оценки результата анализа клинических образцов (в случае соответствия контрольных точек требуемым значениям):

а) проанализировать образцы по каналам возбудителя (HEX/VIC/Yellow), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести анализ соответствующего клинического образца, начиная со стадии **Выделения НК**.

Если для ОКЭ и/или К- зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, образцы этой постановки, интерпретированные как отрицательные, следует учитывать как отрицательные; анализ образцов этой постановки, в которых зафиксировано значение Ct по каналу HEX/VIC/Yellow, необходимо повторить, начиная со стадии **Выделения НК**.

При получении валидного результата отсутствие значения порогового цикла Ct по каналу HEX/VIC/Yellow свидетельствует о том, что результат менее предела обнаружения тест-системы.

Результат ПЦР-анализа учитывается при комплексной диагностике заболевания.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукomплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °C до -16 °C, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °C (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green или значение Ct>29	Некорректный забор биологического материала	повторить забор клинического образца
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК из клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в ОКЭ по каналу HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы

¹ Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест COVID-19»
Комплектация 13

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест COVID-19» предназначена для определения нуклеиновых кислот (НК) коронавируса SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19) методом одностадийной ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» в лабораторной клинической практике.

Комплектация 3 используется для качественного определения возбудителя без стадии экстракции НК. В состав комплектации входит расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ¹

Тест-система «АртТест COVID-19» является высокочувствительным набором для выявления НК.

Аналитическая чувствительность – 100%. Аналитическая специфичность – 100%.

Тест-система содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает точность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций, включая контроли. Тест-система не требует дублирования исследований; допускается постановка единичных реакций (количества реагентов достаточно для выполнения до 10 отдельных постановок амплификации).

Таблица 1. Состав «АртТест COVID-19»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ОТ-ПЦР-реагент	0,5 мл
2. Праймеры COVID-19	1,5 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
Комплект пластика (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется по каналу HEX/VIC/Yellow.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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;
- оптически прозрачные пробирки/стрипы/планшеты для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В качестве клинического материала используются мазки из носоглотки и ротоглотки, помещенные в физраствор или PBS. Отбор образцов производится в соответствии с существующими ТНПА. Перед отбором мазков не допускается проведение гигиенических процедур носоглотки и ротоглотки (в том числе чистка зубов, полоскание и т.п.), а также обработка медицинскими препаратами. Не допускается замораживание образцов. Перед постановкой ПЦР образцы необходимо встряхнуть.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. Каждая постановка амплификации, помимо исследуемых образцов, должна включать 2 контрольных образца:

- отрицательный контроль ПЦР (К-);
- положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить ПЦР-смесь:

5*(N+1) мкл ОТ-ПЦР-реагента + 15*(N+1) мкл праймеров

Где N – общее количество реакций амплификации, включая исследуемые образцы и 2 контрольных образца.

II. Перемешать ПЦР-смесь путем 5-ти кратного переворачивания (или перемешиванием на вортексе в течении 2 – 4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР. Неиспользованные остатки ПЦР-смеси хранению не подлежат.

III. Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 5 мкл исследуемых образцов.

IV. Внести контрольные образцы:

- 1) К-: 5 мкл ОКО;
- 2) К+: 5 мкл ПКО.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

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

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	2 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/Green, HEX/VIC/Yellow	60	15 сек	
Элонгация	67	15 сек	

III. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время прохождения амплификации или после окончания, 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*.

* Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q» перед запуском 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» – 5 FI и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10 FI. В лунке 1 должна стоять пробирка с ПКО, в случае одновременной постановки нескольких тест-

систем, пробирка с ПКО тест-системы, содержащей наибольшее количество анализируемых флуорофоров.

Для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт» установить экспозицию измерений для анализируемых каналов – 1000; при необходимости (смена типа, производителя пробирок/стрипов/плашетов) измерить высоту пробирок согласно инструкции к прибору.

Анализ результатов

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

а) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus/Connect»*:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

– активировать функции «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

б) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «Пороговый (Ct)»;

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации;

в) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Threshold/Порог») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2;

– установить значение параметра выбросов («NTC threshold/Порог Фона») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %;

– активировать функции «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона», в случае некорректного отображения кривых амплификации функции могут быть отключены;

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5», «Line-Gene 9600/9660», «QuantGene 9600», «Gentier 96E», «Gentier 96R», «7500 Real-Time PCR Systems», «Mx 3005P™ QPCR System» и для других амплификаторов открытого типа:

– использовать автоматически установленное прибором значение параметра пороговой линии. В случае некорректной автоматической установки допустимо изменить значение параметра пороговой линии на уровне от 0 до 10 % от полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации.

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

II. Для оценки корректности установки пороговой линии выбрать логарифмическую шкалу для отображения 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	HEX/VIC/Yellow
К-	ОТ-ПЦР	+/-	–
К+	ОТ-ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек К- и К+ необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

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

Таблица 4. Оценка результата анализа клинических образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу	
	FAM/Green	HEX/ VIC/Yellow
Положительный	+/-	≤ 33
Сомнительный	<29	33–35
Отрицательный	<29	> 35 или отсутствует
Невалидный	≥29/-	–

«–» обозначает отсутствие значения Ct, кривая амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения Ct, кривая амплификации пересекает пороговую линию

«+/-» – значение Ct для данного канала не учитывается

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

- а) проанализировать образцы по каналу возбуждения (HEX/VIC/Yellow), для положительных выдать заключение;
- б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;
- в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца.

Если в постановке для ОКЭ и/или К- зафиксировано значение C_t по каналу HEX/VIC/Yellow, образцы, интерпретированные как отрицательные, следует учитывать как отрицательные; анализ остальных образцов необходимо повторить.

При получении валидного результата отсутствие значения порогового цикла C_t по каналам HEX/VIC/Yellow свидетельствует о том, что результат менее предела обнаружения.

Результат ПЦР-анализа учитывается при комплексной диагностике заболевания.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Транспортировка тест-системы осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше $+37^{\circ}\text{C}$ (до 5 суток) или при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

При получении разукomплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24°C до -16°C , допускается хранение тест-системы при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. После вскрытия реагенты стабильны в течение всего срока годности при соблюдении условий хранения.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу FAM/Green или значение Ct>29	Некорректный забор биологического материала	повторить забор клинического образца
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать другие зонды для отбора материала
		использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторите анализ
		использовать новый образец материала провести этап выделения НК для образца
Нет сигнала в K+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в K- по каналу HEX/VIC/Yellow	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры использовать новые наборы

¹ Более полное описание характеристики тест-системы представлено в инструкции по применению