

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

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» является высокочувствительной тест-системой для выявления РНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов в реакции ОТ-ПЦР.

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

В тест-системе «АртТест COVID-19» используется быстрый протокол амплификации, который позволяет за 90–105 мин получить достоверные результаты исследования, что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектации тест-системы «АртТест COVID-19» указаны в таблица 1.

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

| Компонент | Объем, не менее | |
|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | на 50 реакций | на 100 реакций |
| 1. ОТ-ПЦР-реагент | 1 пробирка – 0,25 мл | 1 пробирка – 0,5 мл |
| 2. Праймеры COVID-19 | 1 пробирка – 0,5 мл | 1 пробирка – 1,0 мл |
| 3. ПКО | 1 пробирка – 0,2 мл | 1 пробирка – 0,2 мл |
| 4. ОКО | 1 пробирка – 1,0 мл | 1 пробирка – 1,0 мл |
| 5. ВКО-Р ² | 1 пробирка – 0,5 мл | 1 пробирка – 1,0 мл |

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

Результат амплификации РНК возбудителя регистрируется на канале HEX/Yellow 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 совместно с ВКО-Р³ (10 мкл на выделение) 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. Допускается округление значений в большую сторону.

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

III. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл РНК исследуемых образцов.

IV. Поставить контрольные реакции амплификации:

- 1) К- – внести в пробирку 10 мкл ОКО;
- 2) К+ – внести в пробирку 10 мкл ПКО;
- 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

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, °С | Время | Кол-во циклов |
|--|-----------------|--------|---------------|
| Обратная транскрипция | 55 | 10 мин | 1 |
| Начальная денатурация | 95 | 15 мин | 1 |
| Денатурация | 95 | 15 сек | 10 |
| Отжиг | 60 | 30 сек | |
| Элонгация | 67 | 15 сек | |
| Денатурация | 95 | 15 сек | 35 |
| Отжиг/Детекция по каналам FAM/Green и HEX/Yellow | 60 | 30 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 окончании, 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» 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.

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») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0–30 %**;

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

– при необходимости допускается активация функций «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Коррек. Уклона».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96»*:

– установить значение параметра пороговой линии («Single Threshold») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25–250**;

– при необходимости допускается активация функций «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit».

в) для приборов «ДТ-96»*:

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

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПК0 в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0–30%.**

г) для прочих амплификаторов – см. примечание⁴.

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

** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

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.

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям – анализ необходимо переделать, начиная со стадии экстракции РНК.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

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

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

Таблица 4. Таблица интерпретации результатов образцов

| Результат образца | Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow | Значение «Ct» по каналу FAM/Green |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Положительный | + | +/- |
| Отрицательный | – | + |
| Не валидный | – | - |

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

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

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

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная 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 +8 °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 поставки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора ⁵ |
| | ПЦР ингибирование | разведите образец в 5 раз в воде, свободной от РНКаз и повторите анализ. |
| | | используйте новый образец материала |
| 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 каналам HEX/Yellow в K- и/или ОКЭ | Контаминация | - проведите деконтаминационные процедуры; - используйте новые наборы |

Примечания:

¹ По согласованию с покупателем допускается изменение комплектации тест-системы, не затрагивающие ключевые моменты анализа.

² По желанию покупателя ВКО может быть укомплектован в реагенты для очистки нуклеиновых кислот либо не комплектоваться вообще (в случае, если используется формат тест-системы с детекцией эндогенного внутреннего контроля).

³ В случае использования тест-системы с детекцией эндогенного внутреннего контроля ВКО добавлять не нужно.

⁴ В инструкции приведены рекомендации по наиболее распространённому оборудованию. В случае необходимости, разработчик предоставляет методические указания по работе тест-системы на амплификаторах, отличных от описанных.

⁵ Для приборов Rotor-Gene допустимо использование ПЦР пробирок фирмы-производителя прибора (Qiagen, кат. номер 981005, 981008, 981103, 981106 и др.), а также адаптированный пластик (например, Axugen, кат. номер PCR-0104-C, и др.).