432072 г. Ульяновск,
Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru
Служба технической поддержки:
Тел.: +7 927 981 58 81
E-mail: help@testgen.ru

ТестГен

QR-код к полной инструкции

# Руководство пользователя

# ARVI-test-MAX

## Набор реагентов

**Внимание! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и не заменяет полную инструкцию к набору.**

**Назначение и метод:**

Набор реагентов «ARVI-test-MAX» предназначен для диагностики in vitro для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях для качественного определения специфичных участков геномной РНК вирусов парагриппа 1-4 типов, гриппа A (Influenza A virus, IAV) и гриппа B (Influenza B virus, IBV), коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2, CoV 229E, CoV HKU1, CoV NL63, CoV OC43), риновирусов человека (HRV), респираторно-синцитиального вируса A/B (RSV), метапневмовируса человека A/B (MPV), а также геномной ДНК аденовирусов (ADV) и бокавирусов (BOV) человека методом одностадийной обратной транскрипции – мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в пробах РНК и ДНК, выделенных из клинического материала человека (мазков из носоглотки и ротоглотки, эндотрахеального аспирата, мокроты, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ)), у пациентов с подозрением на наличие указанных инфекций для уточнения этиологии заболевания и выбора соответствующей противовирусной терапии, прогностической оценки течения заболевания и возможных осложнений.

**Метод исследования:**

Одностадийная обратная транскрипция и мультиплексная полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ).

**Материалом для проведения исследования служат:**

Пробы РНК и ДНК, выделенные из клинического материала человека: мазков из носоглотки и ротоглотки, эндотрахеального аспирата, мокроты, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ).

**Наборы для выделения РНК и ДНК:**

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-ЭКСТРА» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 05.06.2023 г.) для ручного и автоматического выделения;
- Набор реагентов для выделения ДНК вирусов, бактерий и грибов и РНК вирусов из клинического материала человека на основе метода обратимого связывания нуклеиновых кислот с поверхностью магнитных частиц с одной промывкой «НК-ЭКСТРА-SW» по ТУ 21.20.23-040-97638376-2021 производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2023/21482 от 12.04.2024 г.);
- Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «МАГНО-сорб» АмплиСенс по ТУ 20.59.52-106-01897593-2012 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (Регистрационное удостоверение Росздравнадзора ФСР 2010/07265 от 19.12.2024 года.

**Состав праймер-миксов, входящих в набор, и соответствующие целевые мишени:**

| **Мультиплекс (праймер-микс)** | **Канал, соответствующий флуорофору** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **FAM/Green** | **ROX/Orange** | **Cy5/Red** | **HEX/ Yellow** |
| **PIV** | РНК вируса парагриппа 1 (HPIV-1) | РНК вируса парагриппа 2 (HPIV-2) | РНК вируса парагриппа 4 (HPIV-4) | ВКО |
| **CoV** | РНК коронавируса NL63 | РНК коронавируса HKU1, OC43 | РНК коронавируса 229E | ВКО |
| **ARP** | ДНК аденовируса (ADV) | РНК риновируса (HRV) | РНК вируса парагриппа 3 (HPIV-3) | ВКО |
| **RMB** | РНК респираторно-синцитиального вируса A/B (RSV) | РНК метапневмовируса A/B (MPV) | ДНК бокавируса (BOV) | ВКО |
| **SAB** | РНК коронавируса SARS-CoV-2 (фрагменты генов *N* и *RdRp*) | РНК вируса гриппа A (IAV) | РНК вируса гриппа B (IBV) | ВКО |

**Время проведения анализа (без учета пробоподготовки):** время проведения ПЦР/ОТ-ПЦР составляет от 80 до 110 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

**Амплификаторы:**

- CFX96
- ДТпрайм
- Rotor-Gene Q
- QuantStudio 5
- FLUORITE
- LOCUS Intero

**Состав набора реагентов «ARVI-test-MAX»:**

| № пп | Название реагента | Описание | Количество, объем |
|---|---|---|---|
| 1. | ОТ-ПЦР-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 2 пробирки, по 1200 мкл |
| 2. | PIV | Прозрачная жидкость сиреневого цвета | 1 пробирка, 480 мкл |
| 3. | CoV | Прозрачная жидкость сиреневого цвета | 1 пробирка, 480 мкл |
| 4. | ARP | Прозрачная жидкость сиреневого цвета | 1 пробирка, 480 мкл |
| 5. | RMB | Прозрачная жидкость сиреневого цвета | 1 пробирка, 480 мкл |
| 6. | SAB | Прозрачная жидкость сиреневого цвета | 1 пробирка, 480 мкл |
| 7. | ПКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 2 пробирки, по 1200 мкл |
| 8. | ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 2 пробирки, по 1800 мкл |
| 9. | ВКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка, 960 мкл |

**Подготовка компонентов для исследования.**

а) тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа РНК/ДНК, ОТ-ПЦР-буфером, соответствующими праймер-миксами, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 секунд, затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием;

б) подготовить необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл для ОТ-ПЦР из расчета для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов + 1 ПКО + 1 ОКО.

**Проведение исследования.**

Пробоподготовку с помощью набора реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-ЭКСТРА» можно проводить для следующих видов биоматериала: мазков из носоглотки и ротоглотки, мокроты. Пробоподготовка осуществляется в соответствии с инструкцией к набору реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала «НК-ЭКСТРА».

Пробоподготовку с помощью набора реагентов для выделения ДНК вирусов, бактерий и грибов и РНК вирусов из клинического материала «НК-ЭКСТРА-SW» можно проводить для следующих видов биоматериала: мазков из носоглотки и ротоглотки. Пробоподготовка осуществляется в соответствии с инструкцией к набору реагентов «НК-ЭКСТРА-SW».

Пробоподготовку с помощью комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «МАГНО-сорб» можно проводить для следующих видов биоматериала: мазков из носоглотки и ротоглотки, эндотрахеального аспирата, мокроты, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ). Пробоподготовка осуществляется в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала «МАГНО-сорб».

Необходимо проводить элюцию в объеме 90 мкл для ручного выделения и 110 мкл при автоматическом выделении.

К каждому исследуемому образцу перед выделением следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «ARVI-test-MAX».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения НК в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя набора реагентов для выделения НК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

Для каждого мультиплекса берется необходимое количество пробирок для исследуемых образцов + 1 ПКО + 1 ОКО.

## Схема внесения реактивов

<table>
<tr><td rowspan="5">на 1 реакцию (для каждого мультиплекса)[1]</td><td colspan="2">ОТ-ПЦР-буфер</td><td>5 мкл</td></tr>
<tr><td colspan="2">Соответствующий праймер-микс</td><td>5 мкл</td></tr>
<tr><td colspan="2">Исследуемый образец РНК/ДНК</td><td>15 мкл</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Контроли</td><td>ПКО</td><td>15 мкл</td></tr>
<tr><td>ОКО (прошедший процедуру выделения НК)</td><td>15 мкл</td></tr>
<tr><td colspan="3">В пробирки для ПКО и ОКО НК не вносится!</td></tr>
</table>

**ВНИМАНИЕ!** Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!

Закрыть пробирки и тщательно перемешать раскапанные смеси на вортексе. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

Обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени состоит из следующих этапов:

а) установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой;

б) запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора.

[1] Рекомендуется сначала приготовить смесь праймер-микса и ОТ-ПЦР-буфера для каждого мультиплекса в отдельной пробирке на 1,5–2,0 мл из расчета: (n+3)x5 мкл ОТ-ПЦР-буфера и (n+3)x5 мкл соответствующего праймер-микса, где n – количество образцов. Перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и внести по 10 мкл в ПЦР-пробирки для соответствующего мультиплекса.

Протокол амплификации для «ARVI-test-MAX»

| Стадия | Температура, ˚С | Время, мин:сек | Каналы детекции | Всего циклов |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 52 | 25:00 | | |
| 2 | 95 | 02:00 | - | |
| 3 | 95 | 00:15 | - | 5 |
| | 64 | 00:20 | | |
| 4 | 95 | 00:15 | - | 40 |
| | 64 | 00:20 | FAM/Green, ROX/Orange, HEX/Yellow, Cy5/Red | |

Допускается единовременная постановка набора реагентов «ARVI-test-MAX» с набором реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (*SARS-CoV-2*) методом прямой ОТ-ПЦР-РВ «Cito-CoV-2-Test» по ТУ 21.20.23-062-97638376-2022 производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение №РЗН 2024/23676 от 23.09.2024), по протоколу «Cito-CoV-2-Test» с задействованными каналами детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red.

**ВНИМАНИЕ!** В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (возможна регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае ΔRn > 100 000, что может привести к получению ложноположительных результатов)! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего всплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 –m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

в) указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой;

г) удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red;

д) запустить ОТ-ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала;

е) по окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

**Регистрация и интерпретация результатов.**

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора или с использованием специального программного обеспечения. Для получения программного обеспечения необходимо обратиться в техническую поддержку.

В случае использования амплификатора FLUORITE (АО «Вектор-Бест», Россия) необходимо установить ПО компании Xi'an Tianlong Science and Technology.

Рекомендации по установке пороговой линии. Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 5–10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям Ct каналов FAM/Green, ROX/Orange, HEX/Yellow, Cy5/Red.

Сначала оценивают прохождение реакции и значения Ct в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

**ВНИМАНИЕ!** В случае использования амплификаторов Rotor- Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10 % в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal). Значение «Коррект. уклона» может быть увеличено до 20 %, исходя из особенностей конкретного прибора.

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты:

| **Контрольный образец** | **Выбранный флуорофор** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **FAM/Green** | **HEX/Yellow** | **ROX/Orange** | **Cy5/Red** |
| ОКО | отсутствует или Ct > 35 | Ct ≤ 32 | отсутствует или Ct > 35 | отсутствует или Ct > 35 |
| ПКО | Ct ≤ 26 | Ct ≤ 28 | Ct ≤ 26 | Ct ≤ 26 |

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных, положительные результаты для соответствующего целевого аналита считаются недостоверными, при этом отрицательные результаты являются достоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений по какому-либо аналиту, отличающихся от указанных, отрицательные результаты для соответствующего целевого аналита считаются недостоверными, при этом положительные результаты являются достоверными. Требуется повторная постановка для соответствующего целевого аналита. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных, необходимо заменить реагенты.

## Принципы интерпретации результатов

| **Значения Ct по каналам детекции, соответствующим флуорофорам (в скобках указаны целевые аналиты)** | | | | **Результат** |
|---|---|---|---|---|
| **PIV** | | | | |
| **FAM/Green (HPIV-1)** | **ROX/Orange (HPIV-2)** | **Cy5/Red (HPIV-4)** | **HEX/Yellow (ВКО)** | |
| Ct ≤ 35 | | | не уч. | РНК соответствующих каналу детекции вирусов **обнаружена** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct ≤ 32 | РНК соответствующих каналу детекции вирусов **не обнаружена или ниже предела обнаружения** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct > 32 или отсутствует | результат **невалидный** |
| **CoV** | | | | |
| **FAM/Green (CoV NL63)** | **ROX/Orange (CoV HKU1 / CoV OC43)** | **Cy5/Red (CoV 229E)** | **HEX/Yellow (ВКО)** | |
| Ct ≤ 35 | | | не уч. | РНК соответствующих каналу детекции вирусов **обнаружена** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct ≤ 32 | РНК соответствующих каналу детекции вирусов **не обнаружена или ниже предела обнаружения** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct > 32 или отсутствует | результат **невалидный** |
| **ARP** | | | | |
| **FAM/Green (ADV)** | **ROX/Orange (HRV)** | **Cy5/Red (HPIV-3)** | **HEX/Yellow (ВКО)** | |
| Ct ≤ 35 | | | не уч. | НК соответствующих каналу детекции вирусов **обнаружена** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct ≤ 32 | НК соответствующих каналу детекции вирусов **не обнаружена или ниже предела обнаружения** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct > 32 или отсутствует | результат **невалидный** |
| **RMB** | | | | |
| **FAM/Green (RSV)** | **ROX/Orange (MPV)** | **Cy5/Red (BOV)** | **HEX/Yellow (ВКО)** | |
| Ct ≤ 35 | | | не уч. | НК соответствующих каналу детекции вирусов **обнаружена** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct ≤ 32 | НК соответствующих каналу детекции вирусов **не обнаружена или ниже предела обнаружения** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct > 32 или отсутствует | результат **невалидный** |
| **SAB** | | | | |
| **FAM/Green (SARS-CoV-2)** | **ROX/Orange (IAV)** | **Cy5/Red (IAB)** | **HEX/Yellow (ВКО)** | |
| Ct ≤ 35 | | | не уч. | РНК соответствующих каналу детекции вирусов **обнаружена** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct ≤ 32 | РНК соответствующих каналу детекции вирусов **не обнаружена или ниже предела обнаружения** |
| Ct > 35 или отсутствует | | | Ct > 32 или отсутствует | результат **невалидный** |

Обозначения: «не уч.» – результат при интерпретации не учитывается

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация вируса в клиническом образце, присутствие ингибиторов в препарате РНК/ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ОТ-ПЦР и др.

В случае невалидного результата заключение не выдается, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

**Срок годности и условия хранения.**

Условия хранения набора

| | **Условия хранения** | **Длительность хранения** | **Примечание** |
|---|---|---|---|
| «ARVI-test-MAX» | от -22 °С до -18 °С | 12 мес. | Допускается заморозка /оттаивание не более 10 раз |

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

**Сроки годности вскрытых компонентов набора:**

Условия хранения и срок годности вскрытых компонентов набора

| | **Условия хранения вскрытых компонентов набора** | **Длительность хранения** |
|---|---|---|
| «ARVI-test-MAX» | от -22 °С до -18 °С | 12 мес. |

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

**По вопросам о продукции компании обращаться:**

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен» (ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru
Служба технической поддержки: Тел.: +7 927 981 58 81 E-mail: help@testgen.ru