

Регистрационное удостоверение  
№ РЗН 2024/22273 от 26 марта 2024 гВ данном вкладыше приведена информация для набора реагентов Вирус Гриппа А H1N1pdm09 в фасовке S.  
Перед началом работы изучите инструкцию.

## Набор реагентов для выявления РНК субтипа вируса гриппа А (Influenza A H1N1pdm09) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Вирус Гриппа А H1N1pdm09)

**REF** R3-P454-23/9 (Фасовка S, пробирки)  
R3-P454-S3/9 (Фасовка S, стрипы<sup>1</sup>)

### Информация о наборе реагентов

**Назначение:**

Набор реагентов предназначен для выявления РНК субтипа вируса гриппа А (Influenza A H1N1pdm09) в биологическом материале человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

**Выделение РНК<sup>2</sup>:**

Рекомендуются наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»), ПРОБА-НК-S, ПРОБА-МЧ-НК-S, ПРОБА-МЧ DWP (ООО «ДНК-Технология ТС).

**Специализированное оборудование:**Детектирующие амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированные в установленном порядке в РФ, например, детектирующие амплификаторы «ДТпрайм»<sup>3</sup>, «ДТлайт»<sup>4</sup> (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Био-Рад Лабораториз, Инк), Applied Biosystems QuantStudio 5, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH).**Время проведения анализа (включая пробоподготовку):**

от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения РНК).

**Количество анализируемых образцов:**

96 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

### Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,62 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" <sup>5</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец <sup>5</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов <sup>6</sup>		12 шт.	

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
Influenza A H1N1pdm09	ВК*	-	-	-

\* - внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"

<sup>1</sup> - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q<sup>2</sup> - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения РНК определяется видом биологического материала<sup>3</sup> - модификация \*M\*<sup>4</sup> - модификация \*S\*<sup>5</sup> - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"» указывается как «РНК-ВК "А"»<sup>6</sup> - входят в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

## Проведение анализа

### 1 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

#### ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

- 1.1** Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

**ВНИМАНИЕ!** Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 6 неизвестных образцов. Для этого нужно промаркировать 6 пробирок для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 8.

- 1.2** Тщательно перемешайте содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

**ВНИМАНИЕ!** Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 1.3** Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 15 x (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «К-» и «К+».

Пример:

Необходимо проанализировать 6 неизвестных образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT для 9 (8+1) пробирок, т.е. 135 мкл ОТ-ПЦР-буфера + 4,5 мкл фермента Taq/RT.

**ВНИМАНИЕ!** При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

- 1.4** Тщательно перемешайте содержимое пробирки с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

- 1.5** Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT. Закройте пробирки/стрипы.

- 1.6** Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

#### ВНИМАНИЕ!

1. Перед внесением в пробирки с реакционной смесью препарата РНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата РНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения РНК.

2. При использовании для выделения РНК комплекта реагентов ПРОБА-НК и набора реагентов ПРОБА-НК-S встряхните пробирки с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-DWP центрифугируйте заклеенный плёнкой глубоколучный планшет с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом при RCF(g) 100 в течение 30 с для осаждения конденсата и снимите плёнку.

3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 1.7** Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл выделенного из образцов препарата РНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+», РНК не вносится.

- 1.8** Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

- 1.9** Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 10 мкл положительного контрольного образца.

- 1.10** Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с (при использовании для проведения ОТ-ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

- 1.11** Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.

- 1.12** Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:  
Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ОТ-ПЦР загрузите соответствующий тест<sup>1</sup>. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ОТ-ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.
- 1.13** Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:  
Проведите ОТ-ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 40 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 3 - 5 соответственно.

Т а б л и ц а 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	35	15	0	1		Цикл
2	92	0	30	1		Цикл
3	92	0	10	8	√	Цикл
	64	0	15			
4	90	0	5	40	√	Цикл
	64	0	15			
5	64	0	5	1		Цикл
6	10 <sup>2</sup>	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

№ / Cycling	Температура, °С / Temperature	Время, с / Hold Time, s	Количество циклов / Cycle Repeats
Cycling	32 deg	1200	1 time
Cycling 2	95 deg	300	1 time
Cycling 3	94 deg	10	50 times
	60 deg √	15	

√ - режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 60 °С

Т а б л и ц а 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	35	20:00	1
2	95	05:00	1
3	94	0:15	50
4	64 √	0:20	

√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °С

Т а б л и ц а 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5

Стадия	№ шага	Температура, °С	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	35	20:00	1
	2	95	05:00	1
Стадия ПЦР	1	94	0:15	50
	2	64 √	0:20	

√ - сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен

<sup>1</sup> - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б инструкции по применению) или предоставляется производителем набора реагентов.

<sup>2</sup> - допускается хранение при температуре 25 °С

**2** **Регистрация и учёт результатов ОТ-ПЦР** проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.

При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 6. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

#### **Предупреждения**

Единичный отрицательный результат исследования, особенно если это образец из верхних дыхательных путей, не исключает инфекции.

Отрицательные результаты не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

Т а б л и ц а 6 – Интерпретация результатов ОТ-ПЦР

<b>Канал детекции</b>		<b>Интерпретация результата</b>
Fam/Green (искомая РНК), Cp/Cq/Ct	Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
<b>Неизвестные образцы</b>		
<b>Указан</b>	Не учитывается	<b>Обнаружена РНК субтипа вируса гриппа А (Influenza A H1N1pdm09)</b>
Не указан	<b>Указан</b>	Не обнаружена РНК субтипа вируса гриппа А (Influenza A H1N1pdm09)
Не указан	Не указан	Недостовверный результат
<b>Отрицательный контрольный образец</b>		
Не указан	<b>Указан</b>	<b>Отрицательный результат Результаты постановки валидны</b>
<b>Положительный контрольный образец</b>		
<b>Указан</b>	Не указан	<b>Положительный результат Результаты постановки валидны</b>

### **Условия транспортирования, хранения и эксплуатации**

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Срок годности набора реагентов - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru