

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2023/21172 от 25 сентября 2023 года**В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов Грипп А Комплекс Н1N1pdm09/Н3N2 в фасовке S. Перед началом работы изучите инструкцию.**

Набор реагентов для выявления РНК субтипов вируса гриппа А (Influenza A(H1N1)pdm09 и Influenza A(H3N2)) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Грипп А Комплекс Н1N1pdm09/Н3N2

**R3-P433-S3/9 (Фасовка S, стрипы)**
R3-P433-23/9 (Фасовка S, пробирки)

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления РНК субтипов вируса гриппа А (Influenza A(H1N1)pdm09 и Influenza A(H3N2)) 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.

Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

Специализированное оборудование:

Амплификаторы детектирующие «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Bio-Rad)

Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2-х часов (в зависимости от количества образцов).

Количество анализируемых образцов:

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем 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" ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ²		12 шт.	

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

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza virus A (H1N1)pdm09	ВК*	-	Influenza virus A (H3N2)	-

* - внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"

¹ - на этикетке компонента для всех фасовок: «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"» указывается как «РНК-ВК "А"»

² - входит в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации в стрипы.

Проведение анализа

1 Выделение РНК

Для выделения РНК из мазков из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспириата, мокроты используют наборы/комплекты для выделения РНК, зарегистрированные в РФ в установленном порядке. Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора/комплекта реагентов.

Таблица 2 – Наборы/комплекты реагентов (производства ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС»), валидированные для использования совместно с набором реагентов Грипп А Комплекс H1N1pdm09/H3N2

Биоматериал	ПРОБА-НК	ПРОБА-НК (сокращенная методика) ¹	ПРОБА- НК-S	ПРОБА-МЧ DWP ПРОБА-МЧ-НК-S
Мазки из носоглотки, ротоглотки	+	+	+	+
Бронхоальвеолярный лаваж	+	-	-	-
Эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	+	-	-	-
Мокрота	+	-	-	-

В ходе подготовки мазков из носоглотки и ротоглотки, взятых в пробирку с транспортной средой, образцов бронхоальвеолярного лаважа, эндотрахеального, назофарингеального аспириата предварительное центрифугирование не требуется.

Для выделения используется **100 мкл образца.**

ВНИМАНИЕ! Объем полученного препарата РНК должен составлять не более 50 мкл. В случае применения для выделения РНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-НК-S и ПРОБА-МЧ DWP возможно увеличение объема до 100 мкл.

Внутренний контрольный образец. В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК использовать внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" из набора реагентов ГриппКомплекс А H1N1pdm09/ H3N2.

РНК-ВК "А" следует использовать в объеме **10 мкл на образец.**

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки **отрицательный контрольный образец** (в его качестве рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего набора/комплекта реагентов, в объёме, указанном в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот).

2 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых **солнечных** лучей на пробирку со смесью для амплификации.

ВНИМАНИЕ! 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!

2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, отрицательного контрольного образца (К-) и 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 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для неизвестных образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 8.

2.2 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.

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

- 15 × (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера,
 - 0,5 × (N+1) мкл фермента Taq/RT,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-» и «К+».

2.4 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.

ВНИМАНИЕ! Смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение одного часа после приготовления.

2.5 Добавьте в каждую промаркированную пробирку, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.

2.6 Встряхните пробирки с неизвестными образцами и контрольными образцами на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

¹ - см. инструкцию

ВНИМАНИЕ! 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 образца перед использованием следующего. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 2.7** Внесите, не повреждая слой парафина, в соответствующие пробирки для неизвестных образцов по 10 мкл полученного из образцов препарата РНК. В пробирки, промаркированные «K-», «K+», РНК не вносится.
- 2.8** Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «K-», 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.
Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «K+», 10 мкл положительного контрольного образца.
- 2.9** Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
- 2.10** Установите все пробирки/стрипы в блок амплификатора.
- 2.11** Для приборов серии ДТ: Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. 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 с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл. В окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.
- 2.12** Для прибора CFX96: Проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведённой в таблице 4.

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	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 ²	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

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

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	35	20:00	1
2	95	5:00	1
3	94	0:15	50
4	64 √	0:20	

√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam, Hex и Cy5 при 64 °C

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

² - допускается хранение при температуре 25 °C

3 **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

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

Т а б л и ц а 5 - Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции			Интерпретация результата
Fam, Cp или Cq	Hex, Cp или Cq	Cy5, Cp или Cq	
Анализируемые образцы			
Указан	Не учитывается	Не указан	Обнаружена РНК Influenza virus A (H1N1)pdm09
Не указан	Не учитывается	Указан	Обнаружена РНК Influenza virus A (H3N2)
Указан	Не учитывается	Указан	Обнаружена РНК Influenza virus A (H1N1)pdm09, обнаружена РНК Influenza virus A (H3N2)
Не указан	Указан	Не указан	Не обнаружена РНК выявляемых вирусов
Не указан	Не указан	Не указан	Недостовверный результат. Требуется либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно)
Отрицательный контрольный образец			
Не указан	Указан	Не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец			
Указан	Не указан	Указан	Положительный результат Результаты постановки валидны

Отрицательные результаты не исключают возможности инфицирования другими субтипами вируса гриппа А (Influenza virus A) и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

Если для биологического образца получены значения Cp/Cq менее 25 на каналах детекции Fam или Cy5, то это говорит о высокой первоначальной концентрации РНК соответствующего возбудителя. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата при микст-инфицировании для возбудителя, РНК которого присутствует в низкой концентрации.

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, в течение всего срока годности 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. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной 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 при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации – 12 месяцев.

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