



1031 2024-04-05

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2024/22273 от 26 марта 2024 г

В 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)

**R3-P454-23/9 (Фасовка S, пробирки)****R3-P454-S3/9 (Фасовка S, стрипы¹)**

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 РНК²:

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»³, «ДТлайт»⁴ (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" ⁵	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец ⁵	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ⁶		12 шт.	

¹ - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения РНК определяется видом биологического материала

³ - модификация *М*

⁴ - модификация *S*

⁵ - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"» указывается как «РНК-ВК "А"»

⁶ - входят в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

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

* - внутренний контрольный образец РНК-БК "А"

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 вариабельного 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 НК.

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 глубоководный 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 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. 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 объема 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	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

- 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.

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.

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.

Таблица 6 - Интерпретация результатов ОТ-ПЦР

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

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