



843 2023-03-22

Регистрационное удостоверение  
№ РЗН 2023/19809 от 15 марта 2023 года**В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов ГриппКомплекс А/В в фасовке S.**  
Перед началом работы изучите инструкцию.

## Набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А и гриппа В методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени ГриппКомплекс А/В

**REF**R3-P449-S3/9 (фасовка S, стрипы)  
R3-P449-23/9 (фасовка S, пробирки)

### Информация о наборе реагентов

**Назначение:**

Набор реагентов предназначен для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) 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.

**Специализированное оборудование:**Амплификаторы детектирующие «ДТлайт»<sup>1</sup>, «ДТпрайм»<sup>2</sup>, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), Rotor-Gene Q (QIAGEN)**Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки):** от 2 часов.**Количество исследуемых образцов:**

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 объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная жидкость от бесцветного до розового цвета 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"*	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец*	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов <sup>3</sup>		12 шт.	
* - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"» указывается как «РНК-ВК "А"»			

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

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

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

<sup>1</sup> - модели \*S\*<sup>2</sup> - модели \*М\*<sup>3</sup> - входят 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 аспирата, мокроты используют наборы/комплекты реагентов 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 ГриппКомплекс А/В

Биоматериал	ПРОБА-НК	ПРОБА-НК (сокращенная методика) <sup>4</sup>	ПРОБА-МЧ-НК-S, ПРОБА-НК-S	ПРОБА-МЧ DWP
<b>Мазки из носоглотки, ротоглотки</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
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 аспирата 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/В.

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 в объеме, указанном в инструкции по применению используемого комплекта/набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот, или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего комплекта/набора реагентов).

### 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», 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 исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Пример: Необходимо проанализировать 6 образцов. Нужно промаркировать 6 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 8.

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

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

**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 одной постановке.

**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** Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** Смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение одного часа после приготовления. Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С.

**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 исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

<sup>4</sup> - см. полную инструкцию

**ВНИМАНИЕ!**

1. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-НК-S необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом РНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную РНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.
2. 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 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 исследуемых образцов по 10 мкл полученного из образцов препарата РНК. В пробирки «К-», «К+» РНК не вносится.
- 2.8** Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К-», 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.
- 2.9** Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К+», 10 мкл положительного контрольного образца.
- 2.10** Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).
- 2.11** Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл.
- 2.12** При использовании приборов серии ДТ: Запустите программное обеспечение RealTime\_PCR в режиме «Работа с прибором». Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объем реакционной смеси и т.п.), для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и ДТ-96 можно сохранить в виде готового файла с параметрами теста. При первом проведении ПЦР загрузите готовый файл с параметрами теста. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 2.11) и проведите ОТ-ПЦР.

Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q приведена в таблице 3.

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

№ /Cycling	Температура, °C /Temperature	Время /Hold Time, sec	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 Green (Fam), Yellow (Hex) и Red (Cy5) при 60 °C			

- 3 Регистрация и учёт результатов ОТ-ПЦР** проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 4. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

### Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

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

Для части, хранящейся при температуре от 2 °C до 8 °C, допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

Для части, хранящейся при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C, допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов, за исключением Фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C 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 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности набора реагентов.

Срок годности набора реагентов по результатам проверки в режиме реального времени при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации – 12 месяцев.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ГриппКомплекс А/В, 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

## Символы, используемые при маркировке набора реагентов

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии (серии)		Нестерильно
	Дата изготовления		

Т а б л и ц а 4 - Интерпретация результатов ОТ-ПЦР

Канал детекции			Интерпретация результата
Fam/Green	Hex/Yellow	Cy5/Red	
<b>Анализируемые образцы</b>			
<b>Ср/Ст указан</b>	Не учитывается	Ср/Ст не указан	<b>Обнаружена РНК Influenza A virus</b>
Ср/Ст не указан	Не учитывается	<b>Ср/Ст указан</b>	<b>Обнаружена РНК Influenza B virus</b>
<b>Ср/Ст указан</b>	Не учитывается	<b>Ср/Ст указан</b>	<b>Обнаружена РНК Influenza A virus Обнаружена РНК Influenza B virus</b>
Ср/Ст не указан	<b>Ср/Ст указан</b>	Ср/Ст не указан	Не обнаружена РНК выявляемых вирусов
Ср/Ст не указан	Ср/Ст не указан	Ср/Ст не указан	Недостовверный результат. Требуется либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно)
<b>Отрицательный контрольный образец</b>			
Ср/Ст не указан	<b>Ср/Ст указан</b>	Ср/Ст не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
<b>Положительный контрольный образец</b>			
<b>Ср/Ст указан</b>	Ср/Ст не указан	<b>Ср/Ст указан</b>	Положительный результат Результаты постановки валидны

Если для биологического образца регистрируется рост уровня флуоресценции для специфического продукта ранее 25 цикла по Ср (Ср менее 25) или ранее 22 цикла по Ст (Ст менее 22), 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. Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ОТ-ПЦР для выделенного препарата РНК с использованием набора реагентов для индивидуального выявления соответствующего вируса.