

Регистрационные удостоверения:

Influenza A virus, Influenza B virus (ГриппКомплекс)
№ ФСР 2011/12014 от 15 июня 2015 года;Пан H1N1
№ ФСР 2010/07921 от 22 ноября 2016 года

**Набор реагентов для выявления РНК вирусов
гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus)
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени
ГриппКомплекс**

Каталожные номера:**Вирус гриппа А (Influenza A virus): R3-P409-23/4 (пробирки)
R3-P409-S3/4 (стрипы)****Вирус гриппа В (Influenza B virus): R3-P410-23/4 (пробирки)
R3-P410-S3/4 (стрипы)**

**Набор реагентов для выявления РНК вирусов пандемического
гриппа А (H1N1) подобных штамму А/California/04/2009
("свиной грипп") методом обратной транскрипции и полимеразной
цепной реакции
Пан H1N1**

Каталожные номера:**R3-P408-23/4 (пробирки)
R3-P408-S3/4 (стрипы)**

Информация о наборах

Назначение:Набор реагентов ГриппКомплекс предназначен для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) в биологическом материале человека *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.Набор реагентов «Пан H1N1» предназначен для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп») *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в биологическом материале человека.

Наборы могут быть использованы в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Материал для исследования:

Мазки и смывы из полости носа и ротоглотки.

Выделение РНК:

Рекомендуется комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Особенности комплектов:

Внутренний контрольный образец (ВК) – присутствует в каждой пробирке с амплификационной смесью, необходим для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:Амплификаторы детектирующие ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3³.**Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):**

от 2,5 часов.

Количество определений:

48

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.² – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.³ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

Состав наборов

Реактив	Количество	
Состав комплекта для проведения обратной транскрипции		
• Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ	50 мкл	1 пробирка
• ОТ-буфер	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Состав комплекта для ПЦР-амплификации кДНК		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок
• ПЦР-буфер	500 мкл	1 пробирка
• Taq-полимераза	25 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец	75 мкл	1 пробирка

Каналы детекции продуктов амплификации

FAM	HEX	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza A virus	BK	-	-	-
Influenza B virus	BK	-	-	-
Пан H1N1	BK	-	-	-

Проведение анализа

1 Выделение РНК

При использовании комплекта реагентов ПРОБА-НК осадок после сушки следует растворять в 50 мкл буфера для растворения. ДНК-БК и РНК-БК не используются.

2 Подготовка и проведение обратной транскрипции

2.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца (К-) по одной пробирке объёмом 0,5 мл.

2.2 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

2.3 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 2,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера;
- 1,0 x (N+1) мкл «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»;
- 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на один образец.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

2.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

2.5 Добавьте в промаркированные пробирки по 3,5 мкл ОТ-смеси.

2.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 16,5 мкл соответствующего образца РНК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку «К-» РНК не вносится.

2.7 В пробирку, маркированную «К-», внесите 16,5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

2.8 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

2.9 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.

Примечание - Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

2.10 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

3.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации (по одной для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+)).

Например, необходимо проанализировать пять образцов. Нужно промаркировать пять пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – семь.

3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 1–3 с при комнатной температуре.

- 3.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10x(N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,5x(N+1) мкл Taq-полимеразы,
- где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на один образец. Например, необходимо проанализировать пять образцов, один «К-» и один «К+». Промаркированных пробирок – семь. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-полимеразы для 8 (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера + 4 мкл Taq-полимеразы.
- 3.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 3.5 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.
- 3.6 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 3.7 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.
- Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
- 3.8 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 3.9 Центрифугируйте пробирки при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 1–3 с при комнатной температуре.
- 3.10 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.
- 3.11 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл с соответствующим названием (Influenza_A.ini, Influenza_B.ini или SwineInfluenza.ini). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест (Influenza_A, Influenza_B или Swine_Influenza), укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (3.10) и проведите ПЦР.
- 4 **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации кДНК и комплект реагентов для проведения обратной транскрипции, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительных контрольных образцов, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности.

Примечание – Допускается многократное замораживание/оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла.

Пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительные контрольные образцы следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности.

Транспортирование наборов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав наборов.

Срок годности наборов – 9 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) и гриппа В (Influenza B virus) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ГриппКомплекс) и набора реагентов для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобного штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп") методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (Пан H1N1), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

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

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:
http://www.dna-technology.ru/customer_support/

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
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