

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2024/22272 от 26 марта 2024 гВ данном вкладыше приведена информация для набора реагентов Вирус Гриппа В в фасовке S.
Перед началом работы изучите инструкцию.**Набор реагентов для выявления РНК
вируса гриппа В (Influenza B virus)
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени
(Вирус Гриппа В)****REF****R3-P453-23/9 (Фасовка S, пробирки)****R3-P453-S3/9 (Фасовка S, стрипы¹)****Информация о наборе реагентов****Назначение:**

Набор реагентов предназначен для выявления РНК вируса 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.

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 Лабораториес, 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 Q² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения РНК определяется видом биологического материала³ - модификация *М*⁴ - модификация *С*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

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

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

* - внутренний контрольный образец РНК-БК "А"

Проведение анализа

1 Подготовка и проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
- При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы», следует строго соблюдать комплектацию 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 взвешив 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.

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

4. 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 носить 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 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	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 Yellow (Hex) и Red (Cy5) 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 (Hex, Cy5) 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 (Vic (Hex), Cy5) 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

Единый 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
Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	Cy5/Red (искомая РНК), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы		
Не учитывается	Указан	Обнаружена РНК Influenza B virus
Указан	Не указан	Не обнаружена РНК Influenza B virus
Не указан	Не указан	Недоверенный результат
Отрицательный контрольный образец		
Указан	Не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Не указан	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