

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора 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

Регистрационное удостоверение:
№ ФСР 2010/07921 от 22 ноября 2016 года
Каталожные номера:
R3-P408-23/4 (пробирки)
R3-P408-S3/4 (стрипы)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1 НАЗНАЧЕНИЕ	3
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	3
2.1 Принцип действия	3
2.2 Состав набора.....	5
2.3 Время проведения анализа.....	6
2.4 Число анализируемых проб.....	6
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	9
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	11
7.1 Подготовка материала к выделению РНК	11
7.2 Выделение РНК из биологического материала	12
7.3 Проведение реакции обратной транскрипции	14
7.4 Проведение полимеразной цепной реакции.....	15
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	18
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	19
10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	20
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	21
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	21
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	21
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ	22
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	22
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	23
ПРИЛОЖЕНИЕ	25

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А (Н1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп") методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Пан Н1N1

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Набор реагентов «Пан Н1N1» предназначен для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А (Н1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп") *in vitro* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в биологическом материале человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки).
- 1.2** Набор может быть использован в клинико–диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно–исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «Пан Н1N1» выпускается в варианте исполнения «ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени».

Вариант исполнения «ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени» (маркируется «Real-time») – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих.

2.1 Принцип действия

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В наборе реагентов «Пан Н1N1» в пробирки со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несет флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации искомой кДНК и внутреннего контрольного образца, включены флуоресцентные метки Fam и Hex соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вирусов гриппа и внутреннего контрольного образца (таблица 1).

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
Пан Н1N1	ВК	-	-	-

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Исследование с использованием набора реагентов «Пан Н1N1» состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие.

2.2 Состав набора

Набор «Пан Н1N1» включает следующие комплекты:

1. **Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА–НК)¹** включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

2. **Комплект реагентов для обратной транскрипции** включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (25 мкл);
- Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ – 1 пробирка (50 мкл).

3. **Комплект реагентов для ПЦР–амплификации кДНК вирусов пандемического гриппа А (Н1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп")**, включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 48 пробирок (по 20 мкл) или 6 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- Таq-полимеразу – 1 пробирка (25 мкл);
- ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);

¹ - включается в набор по запросу.

- положительный контрольный образец – 1 пробирка (75 мкл).
- Крышки для стрипов² – 6 шт.

2.3 Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки) – 5 часов.

2.4 Набор «Пан Н1N1» рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность

В образцах биологического материала, содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (Н1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп"), во время проведения амплификации, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительные результаты амплификации специфических фрагментов кДНК (экспоненциальный рост кривой флуоресценции по каналу Fam).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (Н1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп"), при проведении амплификации, регистрируется положительный результат амплификации внутреннего контроля (экспоненциальный рост кривой флуоресценции по каналу Hex) и отрицательный результат амплификации специфических фрагментов кДНК (отсутствие экспоненциального роста кривой флуоресценции по каналу Fam).

3.2 Чувствительность набора – не более 500 коп/мл.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09

² - в случае использования стрипованных пробирок.

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором следует использовать одноразовые перчатки без талька.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

Выделение РНК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов «Пан Н1N1» требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий (ДТ-322, ДТлайт³, ДТпрайм⁴ или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»));
- центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл с RCF не ниже 16 200 × g (соответствует 13 000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17);
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 50 °С до 95 °С;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 0,5 мл;

³ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

⁴ – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 0,5–10 мкл, 2,0–20 мкл, 20 – 200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;
- комплект для выделения НК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3⁵.
- файл с параметрами анализа «SwineInfluenza.ini».

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют мазки и смывы из полости носа и ротоглотки.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения НК из биологического материала.

6.1 Материал для исследований

Решение о выборе места взятия материала для исследования принимает врач.

⁵ – 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/>

6.1.1 Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

6.1.2 Взятие образцов биологического материала человека

6.1.2.1 Мазки из полости носа

Мазки берут сухим стерильным зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с 300 мкл стерильного физиологического раствора или транспортной средой для биопроб.

Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Зонд с биоматериалом переносят в пробирку с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удаляют избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

6.1.2.2 Мазки из ротоглотки

Мазки берут сухим стерильным зондом вращательным движением с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки глотки. Зонд помещают в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с физиологическим раствором стерильным или транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлекают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удаляют избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируют, пробирку закрывают и маркируют.

6.1.2.3 Смывы из ротоглотки

Перед взятием смывов из ротоглотки проводят предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10-15 с) 8,0-10 мл физиологического раствора стерильного. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования. Смывы из ротоглотки (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.1.2.4 Смывы из полости носа

Взятие материала производят в положении больного сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью зонда или одноразового шприца вводят по 3,0-5,0 мл теплого физиологического раствора стерильного. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования. Смывы (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов.

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования при температуре от 2 °С до 8 °С.

В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка материала к выделению РНК

7.1.1 Мазки и смывы

7.1.1.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

Примечание – Используйте центрифугу для пробирок объемом 1,5 мл с RCF не ниже $16\,200 \times g$ (соответствует 13 000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17).

7.1.1.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.2 Выделение РНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект для выделения РНК из биологического материала не входит в состав набора «Пан Н1N1».

Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемый комплект для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала: ПРОБА-НК.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения РНК из биологического материала совместно с комплектами для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения одновременно с выделением из биологического материала РНК необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК).

7.2.1 Выделение РНК с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

Примечания

1. Перед началом работы необходимо проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе (ПРОБА-НК). В случае выпадения осадка лизирующий раствор прогреть при $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ до полного растворения осадка. Затем перемешать лизирующий раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования.
2. На данном этапе используйте только одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
3. Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец (К-). Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом

1,5 мл внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца и выполните п.п. 7.2.1.1 – 7.2.1.14.

- 7.2.1.1 Добавьте в пробирки с исследуемыми образцами и «К-» по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.
- 7.2.1.2 Плотнo закройте крышки пробирок, встряхните на вортeксе в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортeксе.
- 7.2.1.3 Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.
- 7.2.1.4 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортeксе в течение 3–5 с.
- 7.2.1.5 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.6 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.7 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.2.1.8 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.9 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.10 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.2.1.11 Центрифугируйте пробирки при 13 000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.2.1.12 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.1.13 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 7.2.1.14 Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения и прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 мин, осадите

конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции.

Полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

7.3 Проведение реакции обратной транскрипции

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объёмом 0,5 мл с учётом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).

7.3.2 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 осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Примечание - В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

7.3.3 В отдельной пластиковой пробирке приготовьте ОТ-смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 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-».

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 6. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 7 (6+1) пробирок, т.е. 14 мкл ОТ-буфера + 7 мкл праймеров + 3,5 мкл обратной транскриптазы.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

- 7.3.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 7.3.5 Внесите по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки.
- 7.3.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью (кроме пробирки промаркированной «К-») по 16,5 мкл соответствующего образца РНК (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.3.7 В пробирку, промаркированную «К-», внесите отрицательный контрольный образец, прошедший этап выделения РНК.

Примечание - Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с фильтром.

- 7.3.8 Пробирки встряхните на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 7.3.9 Пробирки поместите в термостат и инкубируйте при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.

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

- 7.3.10 Осадите конденсат центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечания

1. Препарат кДНК допускается хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.
2. Для постановки ПЦР образцы кДНК, хранившиеся при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С, необходимо разморозить при комнатной температуре или при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.4 Проведение полимеразной цепной реакции

- 7.4.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации: по одной для каждого исследуемого образца, отрицательного

контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Пример: Необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 7.

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

7.4.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл Таq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+».

Пример: необходимо проанализировать 5 образцов, один «К-» и один «К+». Промаркированных пробирок – 7. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Таq-полимеразы для 8 (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера + 4 мкл Таq-полимеразы.

7.4.4 Перемешайте приготовленную смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Смесь можно хранить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не более одного часа.

7.4.5 Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл перемешанной смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой.

7.4.6 В каждую пробирку добавьте по одной капле (около 20 мкл) минерального масла, плотно закройте пробирки.

7.4.7 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл соответствующего препарата кДНК (кроме пробирок «К–», «К+»).

- 7.4.8 В пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции.
- 7.4.9 В пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.4.10 Все пробирки центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 7.4.11 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «SwineInfluenza.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «Swine_Influenza», укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста «Swine_Influenza» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2 - Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0	Хранение		Хранение


8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

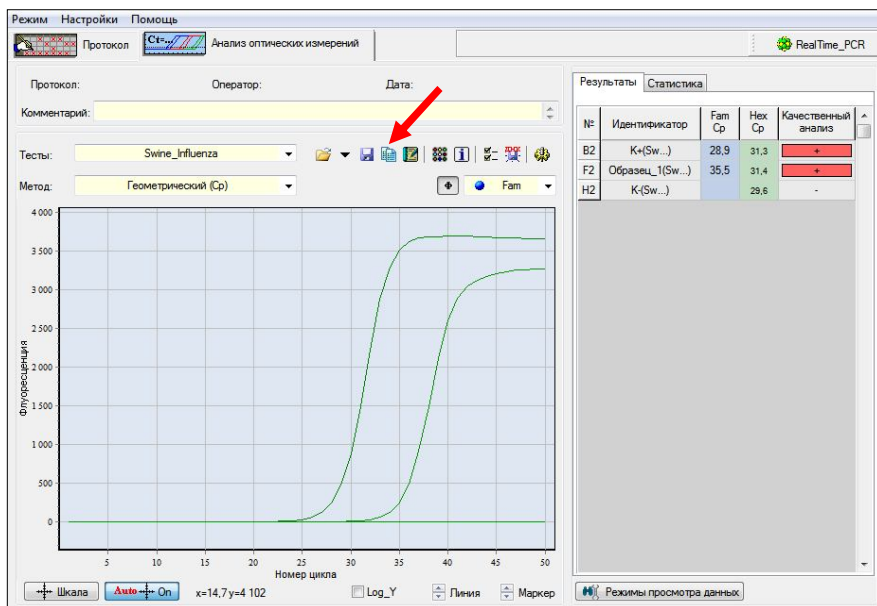
8.1 Регистрация результатов амплификации проводится с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») в соответствии с инструкцией к прибору.

8.2 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчёта необходимо нажать

кнопку «Отчет» .



9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1** Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2** В биологических образцах, содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп"), детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam.
- 9.3** В биологических образцах, не содержащих РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму А/California/04/2009 ("свиной грипп"), и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hex (внутренний контрольный образец), экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam отсутствует (Приложение А).
- 9.4** Результат оценивается программой как недостоверный (нд) в случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта (по каналу

Fam) и для внутреннего контрольного образца (по каналу Hex).

Недостовверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.5 При отсутствии положительного результата (экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam) в положительном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.6 При получении положительного результата (экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Fam) в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

10.2 Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительного контрольного образца, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается многократное замораживание-оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла

10.3 Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином и положительный контрольный образец следует

хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или холодильниках в течение всего срока годности.

- 10.4** Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.
- 10.5** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 11.2** Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.
- 11.3** Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.











12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

- 13.1** Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001:2015 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485:2016 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-Производственное Объединение ДНК-Технология», ООО «НПО ДНК-Технология» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.

адрес: 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

Место производства:

1) ООО «НПО ДНК-Технология»: Россия, 142281, Московская обл. г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

2) ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов «Пан Н1N1», следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, корп.6., тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (звонок по России бесплатный),
+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Приложение А

Таблица А 1 - Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex		
Анализируемые образцы			
Ср указан	Ср указан/не указан	+	Обнаружена РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп")
Ср не указан	Ср указан	-	РНК вирусов пандемического гриппа А (H1N1) подобных штамму A/California/04/2009 ("свиной грипп") не обнаружена
Ср не указан	Ср не указан	нд	Результат недостоверный ⁶
Положительный контрольный образец			
Ср указан	Ср указан/не указан	+	Результат положительный
Отрицательный контрольный образец			
Ср не указан	Ср указан	-	Результат отрицательный

Примечание – Допустимый разброс по Ср для внутреннего контроля в отрицательных образцах ≤ 2 циклам. Для положительных образцов результат амплификации ВК не учитывается.

⁶ - требуется перестановка ПЦР или повторное выделение РНК для данного образца, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

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