



516-1 2024-04-22



## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для выявления РНК  
субтипов вируса гриппа А (Influenza A(H1N1)pdm09 и Influenza A(H3N2))  
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

### **Грипп А Комплекс Н1N1pdm09/Н3N2**

Регистрационное удостоверение  
№ РЗН 2023/21172 от 25 сентября 2023 года

**ВНИМАНИЕ!** Изучите инструкцию перед началом работы

## СОДЕРЖАНИЕ

1.	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ .....	4
2.	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ .....	5
2.1	Состав набора реагентов.....	5
2.2	Количество анализируемых образцов .....	5
2.3	Принцип метода .....	5
2.4	Время проведения анализа .....	6
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	7
3.1	Аналитическая специфичность .....	7
3.2	Интерферирующие вещества.....	7
3.3	Предел обнаружения .....	8
3.4	Диагностические характеристики .....	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	9
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ .....	11
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ .....	12
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА .....	14
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ .....	18
9	УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ .....	19
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ .....	21
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ .....	22
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	22
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ .....	22
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	22
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	23
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ .....	24
	Приложение А .....	25
	Приложение Б .....	27

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ВК	- внутренний контроль
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К-	- отрицательный контрольный образец
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота

## **1 ПРЕНАНАНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

- 1.1** Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления РНК субтипов вируса гриппа А (Influenza A(H1N1)pdm09 и Influenza A(H3N2)) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Грипп А Комплекс H1N1pdm09/H3N2), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Назначение: набор реагентов предназначен для выявления РНК субтипов вируса гриппа А (Influenza A(H1N1)pdm09 и Influenza A(H3N2)) 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.
- 1.3** Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.
- 1.4** Показания к проведению исследования:
- наличие симптомов и контакт с больными гриппом;
  - пребывание в очагах инфекции (с целью раннего выявления возможного инфицирования и предотвращения дальнейшего распространения);
  - дифференциальная диагностика гриппа.
- Противопоказаний к применению нет.
- 1.5** Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.
- 1.6** Область применения: набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.
- 1.7** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
- 1.8** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

### 2.1 Состав набора реагентов

<b>REF R3-P433-S3/9, фасовка S, стрипы</b>			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	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" <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

<b>REF R3-P433-23/9, фасовка S, пробирки</b>			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 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" <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец <sup>1</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

### 2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

### 2.3 Принцип метода

**Метод:** обратная транскрипция РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени; качественный анализ.

**Принцип метода** основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными

<sup>1</sup> - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"» указывается как «РНК-ВК "А"»

последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК проводят в одной пробирке, что повышает чувствительность метода, уменьшает вероятность контаминации и снижает время проведения исследования.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина или использования Taq-полимеразы, блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав набора реагентов включен внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" который предназначен для оценки этапа выделения РНК и качества прохождения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит 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) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК вирусов Influenza virus A(H1N1)pdm09, включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК вирусов Influenza virus A(H3N2), включена флуоресцентная метка Cy5.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта внутреннего контрольного образца, входит флуоресцентный краситель Hex. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza virus A(H1N1)pdm09	ВК*	-	Influenza virus A(H3N2)	-

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

Исследование состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификация кДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов Грипп А Комплекс H1N1pdm09/H3N2.

**2.4** Время проведения анализа (включая пробоподготовку) – от 2-х часов.

### 3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих РНК выявляемых вирусов, во время проведения амплификации детектирующий амплификатор должен регистрировать экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих РНК выявляемых вирусов, при проведении амплификации экспоненциальный рост уровня флуоресценции по заявленным каналам детекции отсутствует.

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций каждой из систем олигонуклеотидов, входящих в состав набора реагентов, по отношению к вирусам, определяемым другими системами.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце РНК Influenza virus A(H7N9), Influenza B virus, Human Coronavirus 229E, Human Coronavirus HKU-1, Human Coronavirus NL-63, Human Coronavirus OC-43, Human Metapneumovirus, Human Parainfluenza virus type 1, Human Parainfluenza virus type 2, Human Parainfluenza virus type 3, Human Parainfluenza virus type 4, Human Rhinovirus, MERS-CoV, Respiratory syncytial virus, SARS-CoV-2, ДНК Human Adenovirus, Human Bocavirus, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant), *Streptococcus pneumoniae*, а также ДНК человека в концентрации до  $10^8$  копий/мл образца.

В ходе проведения валидационных испытаний показано наличие специфических результатов амплификации при наличии в образце РНК, выделенной из 17 штаммов гриппа А субтипов А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) различных эпидемических сезонов.

#### 3.2 Интерферирующие вещества

Наличие в образцах биологического материала интерферирующих веществ, которые могут ингибировать ПЦР, может являться причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком полного ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфических продуктов.

К интерферирующим веществам, ингибирующим ПЦР, отнесены:

- эндогенные вещества (цельная кровь, лейкоциты, слизь);
- экзогенные (вещества, добавляемые в образцы биоматериала в процессе пробоподготовки (изопропиловый спирт и метилацетат), местные лекарственные препараты).

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на проведение амплификации, составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца РНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца РНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца РНК.

Интерферирующее влияние таких веществ, как лейкоциты, слизь, местные лекарственные препараты, которые могут содержаться в образцах биоматериала в клинически значимых концентрациях, не наблюдалось.

Для снижения количества интерферирующих веществ, ингибирующих ПЦР, необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения нуклеиновых кислот, позволяющие произвести их максимальное удаление из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения нуклеиновых кислот.

### 3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения: 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку.

Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений двух серий лабораторного контрольного образца (ЛКО).

Предел обнаружения РНК в образце биоматериала зависит от метода пробоподготовки образца и конечного объёма выделенной РНК (объёма элюции).

Предел обнаружения 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации РНК в образце при использовании наборов/комплектов реагентов для выделения нуклеиновых кислот:

Биоматериал	Комплект/набор для выделения	Объём полученного препарата, мкл	Предел обнаружения, копий/мл образца
Мазок из носоглотки, ротоглотки в 500 мкл транспортной среды;	ПРОБА-НК	50	1000
	ПРОБА-НК-S	50	1000
	ПРОБА-МЧ-НК-S	100	2000
	ПРОБА-МЧ DWP	100	2000
Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират	ПРОБА-НК	50	1000
Мокрота (предобработка с Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	ПРОБА-НК	50	2000
Мокрота (предобработка с муколизинном)	ПРОБА-НК	50	5000



### 3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Патоген	Диагностическая чувствительность		Диагностическая специфичность	
		Исследовано образцов	Значение, (95 % ДИ)	Исследовано образцов	Значение, (95 % ДИ)
Мазки из носоглотки	Influenza virus A(H1N1)pdm09	25	100 % (86,28 – 100)	25	100 % (86,28 – 100)
	Influenza virus A(H3N2)	25	100 % (86,28 – 100)		
Мазки из ротоглотки	Influenza virus A(H1N1)pdm09	25	100 % (86,28 – 100)	25	100 % (86,28 – 100)
	Influenza virus A(H3N2)	25	100 % (86,28 – 100)		
Аспират назофарингеальный и эндотрахеальный	Influenza virus A(H1N1)pdm09	35	100 % (90,00 – 100)	35	100 % (90,00 – 100)
	Influenza virus A(H3N2)	35	100 % (90,00 – 100)		
Бронхоальвеолярный лаваж	Influenza virus A(H1N1)pdm09	25	100 % (86,28 – 100)	25	100 % (86,28 – 100)
	Influenza virus A(H3N2)	25	100 % (86,28 – 100)		
Мокрота	Influenza virus A(H1N1)pdm09	25	100 % (86,28 – 100)	25	100 % (86,28 – 100)
	Influenza virus A(H3N2)	25	100 % (86,28 – 100)		
<b>Итого</b>		270	100 % (98,64 – 100)	135	100 % (97,30 – 100)

## 4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

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

Выделение РНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

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

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение нуклеиновых кислот и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

**ВНИМАНИЕ!** Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

#### Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасных компонентов	Указание на риски
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	<b>Азид натрия менее 0,1%</b>	Является безопасным для конечного пользователя
ОТ-ПЦР-буфер	<b>Азид натрия менее 0,1%</b>	Является безопасным для конечного пользователя
Фермент Taq/RT	Нет опасных веществ	-
Внутренний контрольный образец РНК-ВК "А"	<b>Азид натрия менее 0,1%</b>	Является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец	<b>Азид натрия менее 0,1%</b>	Является безопасным для конечного пользователя

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не использовать набор реагентов:

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

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, 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 требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор «ДТпрайм» (модификация \*M\*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229  
или амплификатор «ДТлайт» (модификация \*S\*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228  
или амплификатор CFX96, Bio-Rad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- микроцентрифуга-вортекс;
- ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (только для фасовки S, стрипы);
- холодильник с морозильной камерой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- набор/комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала.

Рекомендуются:

- Комплект реагентов ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867;
- Набор реагентов ПРОБА-НК-S, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11296;
- Набор реагентов ПРОБА-МЧ-НК-S, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15267;
- Набор реагентов ПРОБА-МЧ DWP, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15090.

## 6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

### 6.1 Материал для исследования

Для исследования используют биологический материал человека (мазок из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота).

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09, СанПин 3.3686-21.

**Ограничение метода:** местное применение лекарственных препаратов (спреи, капли, кремы и мази) менее, чем за 24 часа до исследования. При использовании аэрозолей и других форм лекарственных препаратов для ингаляций при лечении бронхиальной астмы материал для исследований следует брать не ранее, чем через три часа после ингаляции.

### 6.2 Общие требования

6.2.1 На этапах подготовки биоматериала и выделения из него РНК, за исключением этапа отбора надосадочной жидкости с использованием аспиратора, используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.2.2 При добавлении раствора в пробирку, содержащую биологический материал, аккуратно вносите жидкости, не касаясь стенок пробирок. При касании к стенке пробирки смените наконечник. Наконечник следует менять при каждом удалении раствора из образца.

6.2.3 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить образец/реагент или из которой будете забирать жидкость, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

### 6.3 Взятие материала на исследование

#### 6.3.1 Мокрота

Взятие материала осуществляют в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объёмом не менее 50 мл в количестве не менее 1,0 мл.

После сбора материала флакон плотно закрывают и маркируют.

Примечание: Мокрота подлежит предобработке. Процедура предобработки мокроты раствором трёхзамещенного фосфорнокислого натрия ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) или муколизином, приведена в инструкции к комплекту реагентов «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС)», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867, раздел «Взятие и подготовка клинического материала» (Мокрота (способ 1 и способ 2)).

#### 6.3.2 Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират

Взятие материала производится в пустые одноразовые плотно завинчивающиеся пробирки объёмом до 50 мл. После взятия материала пробирку плотно закрывают и маркируют.

### 6.3.3 Мазок из носоглотки, ротоглотки

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, в зависимости от источника биологического материала согласно установленной процедуре (например, Зонд медицинский одноразовый стерильный РУ № РЗН 2021/13989).

После взятия материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания жидкости.

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

## 6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

### 6.4.1 Мокрота

Образцы мокроты допускается хранить:

- при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

### 6.4.2 Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират

Бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират допускается хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели

**ВНИМАНИЕ!** Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### 6.4.3 Мазок из носоглотки, ротоглотки

Условия транспортирования и хранения мазков из носоглотки, ротоглотки определяются инструкциями по применению рекомендуемых транспортных сред и наборов/комплектов реагентов для выделения РНК.

Дальнейшая обработка указанных выше видов биологического материала осуществляется согласно инструкциям по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения РНК.

## 7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

**ВНИМАНИЕ!** Диапазон вирусной нагрузки для вирусов гриппа может варьировать в широких пределах. В связи с этим при выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для предупреждения кросс-контаминации биоматериалом в лаборатории рекомендуется выполнение следующих правил:

1. Необходимо проводить визуальную оценку поступившего биоматериала и выбраковку всех образцов, если среди них есть пробирки с нарушенной герметичностью.
2. По возможности выделять в отдельный поток образцы от пациентов из стационара с симптомами острой инфекции и анализировать их отдельно от остальных образцов (биоматериал для скрининга контактировавших лиц и пациентов с легким течением заболевания). Работу с предполагаемыми высококопийными образцами желательно выполнять в отдельном боксе или после работы с предполагаемыми низкокопийными образцами.
3. Обязательно выполнять постановку отрицательных контрольных образцов, начиная с этапа выделения РНК, в каждом протоколе.
4. Использовать на всех этапах исследования наконечники с аэрозольными фильтрами.
5. Четко соблюдать методику выполнения исследования, открывать пробирки типа Эппендорф при помощи пинцета (не допускать касаний руки в перчатке внутренней части крышки пробирки); при внесении реагентов не касаться наконечником пробирки (если это произошло, сразу заменить наконечник).

### 7.1 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.

### **ВНИМАНИЕ!**

1. Наборы реагентов ПРОБА-НК-S, ПРОБА-МЧ-НК-S; ПРОБА-МЧ DWP предназначены **только** для выделения нуклеиновых кислот из мазков из носоглотки, ротоглотки!
2. 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.

**ВНИМАНИЕ!** Полученный препарат РНК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Допускается однократное замораживание и хранение препарата РНК при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток.

Таблица 2 – Наборы/комплекты реагентов, валидированные для выделения РНК для дальнейшего исследования набором реагентов Грипп А Комплекс H1N1pdm09/H3N2

Набор/комплект реагентов, РУ	Комплектация	Биоматериал
Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867	<b>ПРОБА-НК</b>	Мазки из носоглотки, ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, эндотрахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота
	<b>ПРОБА-НК (сокращенная методика в соответствии с Приложением А)</b>	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК-S), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/11296	<b>ПРОБА-НК-S</b>	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ-НК-S), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15267	<b>ПРОБА-МЧ-НК-S</b>	Мазки из носоглотки, ротоглотки
Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ DWP), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15090	<b>ПРОБА-МЧ DWP</b>	Мазки из носоглотки, ротоглотки

7.1.1 Особенности предобработки биоматериала для последующего исследования с применением набора реагентов Грипп А Комплекс H1N1pdm09/H3N2

**ВНИМАНИЕ!** 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**.

7.1.2 Использование контрольных образцов на этапе выделения нуклеиновых кислот

#### **Внутренний контрольный образец**

Для исключения ложноотрицательных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно добавление **внутреннего контрольного образца** в неизвестные образцы на этапе выделения нуклеиновых кислот.

В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК необходимо использовать **внутренний контрольный образец РНК-ВК "А" из набора реагентов Грипп А Комплекс H1N1pdm09/H3N2**.

РНК-ВК "А" следует использовать **в объеме 10 мкл на образец**.

Примечание – Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) и внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) из комплекта реагентов ПРОБА-НК при выделении РНК не используют.



### Отрицательный контрольный образец

Для исключения ложноположительных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно использование **отрицательного контрольного образца** с этапа выделения нуклеиновых кислот.

На этапе выделения нуклеиновых кислот обязательно подготовить **отрицательный контрольный образец** и провести его через все этапы выделения одновременно с выделением РНК из неизвестных образцов.

В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, или отрицательный контрольный образец, входящий в состав соответствующего набора/комплекта реагентов, в объёме, указанном в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

**7.2** 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!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

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

7.2.2 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.

Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

7.2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной 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 с ферментом 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.

7.2.4 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.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера с ферментом Taq/RT.

7.2.6 Встряхните пробирки с препаратом РНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

**ВНИМАНИЕ!** Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок/стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина, в соответствующие пробирки для неизвестных образцов по 10 мкл полученного из образцов препарата РНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», РНК не вносится.

Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К-», 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, в пробирку, промаркированную «К+», 10 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.2.10 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.2.11 Для приборов серии ДТ: запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ОТ-ПЦР загрузите соответствующий тест<sup>1</sup>. 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 с учетом объёма реакционной смеси, равного 40 мкл. В окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

<sup>1</sup> - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

7.2.12 Для прибора CFX96: проведите ОТ-ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 40 мкл, по программе амплификации, приведенной в таблице 4.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	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 <sup>1</sup>	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Таблица 4 – Программа амплификации для прибора CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин:сек	Количество циклов (повторов)
1	35	20:00	1
2	95	5:00	1
3	94	0:15	50
4	64 √	0:20	

√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по каналам Fam, Hex и Cy5 при 64 °C

## 8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

<sup>1</sup> - допускается хранение при температуре 25 °C

## 9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

**9.1** Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

**ВНИМАНИЕ!** При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».

Таблица 5 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции			Интерпретация результата
Fam, Cp или Cq	Hex, Cp или Cq	Cy5, Cp или Cq	
<b>Неизвестные образцы</b>			
<b>Указан</b>	Не учитывается	Не указан	<b>Обнаружена РНК Influenza virus A(H1N1)pdm09</b>
Не указан	Не учитывается	<b>Указан</b>	<b>Обнаружена РНК Influenza virus A(H3N2)</b>
<b>Указан</b>	Не учитывается	<b>Указан</b>	<b>Обнаружена РНК Influenza virus A(H1N1)pdm09 обнаружена РНК Influenza virus A(H3N2)</b>
Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Не обнаружена РНК выявляемых вирусов
Не указан	Не указан	Не указан	Недостовверный результат. Требуется либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно)
<b>Отрицательный контрольный образец</b>			
Не указан	<b>Указан</b>	Не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
<b>Положительный контрольный образец</b>			
<b>Указан</b>	Не указан	<b>Указан</b>	Положительный результат Результаты постановки валидны

**9.2** Недостовверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из биологического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторное выделение препарата нуклеиновых кислот, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

**9.3** При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

**9.4** При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

#### **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.

Отрицательные результаты не исключают возможности инфицирования другими субтипами вируса гриппа А (Influenza virus A) и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

Если для биологического образца получены значения  $C_p/C_q$  менее 25 на каналах детекции  $Fam$  или  $Cy5$ , 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.

## 10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

### 10.1 Транспортирование

- 10.1.1 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, в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.1.2 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.
- 10.1.3 Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

### 10.2 Хранение

- 10.2.1 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. Пробирки/стрипы со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в защищённом от света месте.
- 10.2.2 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.
- 10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

### 10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.
- 10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- 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. 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 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

## 11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.
- 11.2** Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

## 12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

## 13 РЕМОУТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

- 13.1** Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

## 14 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 n тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии (серии)		Нестерильно
	Дата изготовления		

## 15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

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

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 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

**Производитель:** Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

**Адрес производителя:**

117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

**Место производства:**

ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

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](mailto:hotline@dna-technology.ru)

[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)



**Сокращенная методика выделения РНК из исследуемого материала  
(мазки из носоглотки и ротоглотки) с использованием комплекта реагентов  
ПРОБА-НК**

Примечание – В случае выпадения осадка в лизирующем растворе флакон прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

1. Промаркируйте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл (с защёлкивающимися крышками, если необходимо) с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца (К-).
2. Внесите в каждую пробирку по 10 мкл предварительно перемешанного на микроцентрифуге-вортексе внутреннего контрольного образца РНК-ВК "А" из набора реагентов Грипп А Комплекс Н1N1рdm09/Н3N2.
3. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.
4. Внесите в пробирки для неизвестных образцов по 100 мкл исследуемого материала. Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца.
5. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
6. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин.
7. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
8. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
9. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).
10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
11. Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
12. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 в течение 1 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).
13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки),
14. Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
15. Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000–16000 в течение 1 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).
16. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Допускается оставить жидкость, покрывающую осадок, объемом не более 20–30 мкл.

17. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
18. Добавьте к осадку **50 мкл** буфера для растворения, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с.
19. Прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 5 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
20. Осадите конденсат центрифугированием при RCF(g) 12000–16000 в течение 30 с при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

Препарат РНК готов для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Полученный препарат РНК необходимо в течение двух часов использовать для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Для возможности проведения повторного исследования оставшуюся РНК следует сразу же поместить в морозильную камеру и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток, не размораживая до постановки.

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующего амплификатора «ДТпрайм», «ДТлайт»**

- 1) «Тип анализа» - выбрать «Мультиплекс\_q+»
- 2) Указать количество пробирок в тесте – 1;
- 3) Указать объём реакционной смеси – 40 мкл;
- 4) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ 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 <sup>1</sup>	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

- 5) «Каналы детекции», внести следующие параметры

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza virus A(H1N1)pdm09	ВК	-	Influenza virus A(H3N2)	-

<sup>1</sup> - допускается хранение при температуре 25 °С

ООО «ДНК-Технология»

117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,

ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

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](mailto:hotline@dna-technology.ru)