

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И. Покровский
«12» ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в

клиническом материале методом полимеразной цепной

реакции (ПЦР) с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL»

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

«_____» _____ 200 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в

клиническом материале методом полимеразной цепной

реакции (ПЦР) с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL»

«СОГЛАСОВАНО»

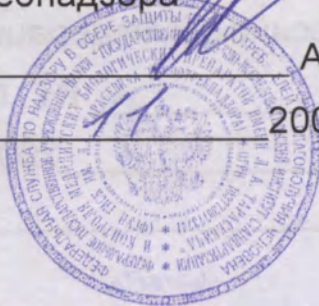
И.О.директора ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора

А.А.Мовсесянц

« 12 »

2009 г.



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	4
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	9
ВАРИАНТ FER	11
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	14
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	14
Б. Проведение амплификации	15
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	16
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
ВАРИАНТ FRT	19
СОСТАВ	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	22
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ /ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	22
А. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50 F	24
В. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F и «ПЦР-комплект» вариант FRT 200 F	26
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
В-	- отрицательный контроль экстракции РНК
В+	- положительный контроль экстракции РНК
кДНК	- комплементарная ДНК
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FER	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- Федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» предназначен для выявления РНК вируса гриппа *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* выделенной из клинического материала (мазки из полости носа и ротоглотки, мокрота (либо аспираты из носоглотки и трахеи), секционный материал (фрагменты пораженной части легких) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление вируса гриппа *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракцию (выделение) РНК из образцов клинического материала, амплификацию фрагмента кДНК и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция РНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-STI-гес), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции, в ходе которой получают кДНК. Пробы кДНК используются для амплификации участка кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT - непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 вариантах.

Вариант FEP

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP 50.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP 200.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50 F.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 200 F.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения обратной транскрипции и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Комплект для выделения РНК/ДНК	Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
«РИБО-преп»	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FRT	1х10 ³ копий/мл
	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FEP	1х10 ³ копий/мл
«РИБО-сорб»	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FRT	5х10 ³ копий/мл
	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FEP	5х10 ³ копий/мл

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент гена гемагглютинаина вирусов гриппа A/H1N1, относящиеся к Северо-Американской линии вирусов гриппа свиней. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании изолятов A/California/04/2009(H1N1) и A/California/07/2009(H1N1), предоставленных CDC.

Доказано отсутствие активности набора реагентов в отношении 26 эталонных штаммов и изолятов эпидемических вирусов гриппа A/H1N1 выделенных с 1977 по 2008 гг. в РФ, Республиках Украина и Беларусь, вирусов гриппа А субтипов H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H2N9, H3N2, H3N8, H4N6, H11N6, H12N5, H1N1, H6N2, H10N7, H5N3, H7N1, H5N2, H5N3, H2N2, вируса гриппа В линий Ямагата и Виктория, а также штаммов и изолятов основных возбудителей ОРЗ человека и нуклеиновых кислот генома человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при

Исх

13/

исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности» и методических рекомендаций «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высокопатогенными штаммами вируса гриппа А (H1N1), у людей» Роспотребнадзора.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения РНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.
3. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК (например «NucliSENS®

easyMAG™» («bioMérieux», Франция) – при использовании автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот.

4. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например «NucliSENS® easyMAG™» (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) («bioMérieux», Франция)) – при использовании автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот.
5. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТАЛ» (ТУ 9398-005-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЗ Роспотребнадзора – при работе с вариантом FEP (формы 1, 2, 3 и 4) и вариантом FRT (форма 1 и 2).
6. Дополнительные материалы и оборудование для проведения реакции обратной транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для ОТ – при работе с вариантом FEP (формы 1, 2, 3 и 4) и вариантом FRT (форма 1 и 2).
7. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
8. Центрифуга/вортекс.
9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
10. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл и от 50 до 1000 мкл).
11. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
12. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
15. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

16. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), «MAXYGENE» («Axygen», США), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Uno-2» («Biometra») или аналогичные).
17. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
18. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые ПЦР-пробирки с плоской крышкой объемом 0,2 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки

13
указанного объема (например, «GeneAmp PCR System 2700», «MaxyGene» и др) или объемом 0,5 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, «Терцик» и др.).

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

19. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» – при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT (например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия), «Mx3000P» («Stratagene», США), «Mx3000» («Stratagene», США), «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия), «SmartCycler II» («Cepheid», США) или аналогичные).
20. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые ПЦР-пробирки с плоской крышкой объемом 0,2 мл для приборов формата ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene» для постановки в ротор на 36 пробирок) или с куполообразной крышкой на 0,2 мл для приборов формата ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «Mx 3000P», ДТ-96 и др.).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат мазки из полости носа и ротоглотки, мокрота (либо аспираты из носоглотки и трахеи), секционный материал (фрагменты пораженной части легких).

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Мазки используются без предварительной обработки.

Мокрота или аспират из трахеи. Для предварительной подготовки дополнительно требуется реагент «МУКОЛИЗИН» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для выделения РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочная жидкость (100 мкл) используют для выделения РНК. При

ВАРИАНТ РЕЗ

необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

ВАРИАНТ РЕЗ

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-анализ» вариант РЕЗ М – комплект реагентов для амплификации и детекции фрагмента ДНК – вирусной RNA (АТН/ПН/ДНК) с использованием флуоресцентной детекции на автоматизированной платформе.

ПЦР-субстрат-5'-3' / RT-субстрат-5'-3'	Гидролизный детектирующий субстрат	0,12	1 ампула
ПЦР-субстрат-3'-5'	Гидролизный детектирующий субстрат	0,77	1 ампула
ПЦР-субстрат-Флуор	Полученный детектирующий субстрат	0,2	1 ампула
Мини-растворитель для ПЦР	Детектирующий субстрат	4,0	1 флакон
ДНК для ПЦР	Температурно-стабильный ДНК	1,1	1 флакон
ПЦР-ДНК-деградация virus АТН-субстрат	Гидролизный детектирующий субстрат	0,1	1 ампула
ПЦР-ДНК-деградация	Гидролизный детектирующий субстрат	0,1	1 ампула
ТБ-буфер	Полученный детектирующий субстрат	0,2	1 ампула

Комплект реагентов «ПЦР-анализ» на платформе 30-каналов автоматизированной системы контроля.

Комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы и инструкция к использованию.

ПЦР	Детектирующий субстрат	0,2	1 ампула
ПЦР-ДНК-деградация	Детектирующий субстрат	0,12	1 ампула

Комплект реагентов «ПЦР-анализ» вариант РЕЗ МБ – комплект реагентов для амплификации и детекции фрагмента ДНК – вирусной RNA (АТН/ПН/ДНК) с использованием флуоресцентной детекции на автоматизированной платформе.

ВАРИАНТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP 50 – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	1,7	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP 200 – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

11
11/05/20

ВАРИАНТ FEP

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	4 пробирки
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	2 флакона
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	1,7	3 пробирки
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1-swine* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ОТ-ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие РНК вируса гриппа *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Проводят при помощи:

- комплекта реагентов «РИБО-сорб» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией к комплекту;

ВНИМАНИЕ! Объем добавляемого ВКО STI-rec – 10 мкл.

- комплекта реагентов «РИБО-преп» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией к комплекту;

автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» (производства «bioMérieux», Франция) с использованием протоколов указанных в «Методических рекомендациях по проведению экстракции РНК/ДНК при использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» для последующего применения набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL».

ВНИМАНИЕ! Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-rec. В качестве отрицательного контроля экстракции (В-) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» – кат.№№ КЗ-4-100, КЗ-4-50, содержащий RT-G-mix-1 – или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Для форм комплектации 1 и 2:

1. Пробирку с **воском для ПЦР** прогреть в термостате при температуре 95 °С до полного расплавления.
2. Раскапать на дно микропробирок для амплификации по **8 мкл ПЦР-смеси-1-FEP/FRT Influenza virus A/H1-swine**.
3. Сверху добавить по капле (примерно 10 - 15 мкл) расплавленного воска так, чтобы он полностью накрыл жидкость, закрыть крышки пробирок, подписать на каждой сокращенное название инфекции. Пробирки с разлитой **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT Influenza virus A/H1-swine** и воском можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 нед.

Для форм комплектации 3 и 4:

4. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT Influenza virus A/H1-swine** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.

Для всех форм комплектации:

5. В пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT Influenza virus A/H1-swine** на поверхность застывшего воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT Influenza virus A/H1-swine**.
6. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
7. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-**

FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine* на поверхность застывшего воска внести 17 мкл ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine*. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР.

8. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб кДНК, полученных в ходе проведения реакции обратной транскрипции из исследуемых или контрольных образцов.
9. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль *Influenza virus A* (K⁺_{H1-swine}) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A H1-swine*.
 - в) положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО STI-88.
 - г) отрицательный контроль экстракции (выделения) (В-) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из ОКО.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне чувствительности теста относительно дозы ДНК, содержащейся в образце.

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)*

Амплификатор с активным регулированием (по раствору в пробирке):				Амплификатор с матричным регулированием температуры: «Uno-2» («Biometra»)					
«Терцик» («ДНК-Технология»)				«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cyclер» («Corbett Research»), «Maxygene» («Axygen Scientific»)					
Цикл	Темпе- ратура	Время	Циклы	Темпе- ратура	Время	Циклы	Темпе- ратура	Время	Циклы
0	95 °C	пауза		95 °C	пауза		95 °C	пауза	
1	95 °C	5 мин	1	95 °C	5 мин	1	95 °C	5 мин	1
2	95 °C	10 с	42	95 °C	10 с	42	95 °C	25 с	42
	54 °C	20 с		54 °C	25 с		54 °C	40 с	
	72 °C	10 с		72 °C	25 с		72 °C	25 с	
3	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1
4	10 °C	хранение		10 °C	хранение		10 °C	хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к детекции результатов.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)*.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к «ПЦР-комплекту» и методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие РНК вируса гриппа *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для

контрольных образцов и проб кДНК, полученных путем экстракции из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения положительного результата.
- кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу FAM выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX ниже установленного порогового значения отрицательного результата, и сигнал по каналу FAM ниже установленного порогового значения.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями).

Если для пробы получен **невалидный** или **сомнительный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК, в соответствии с табл. 2.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу	
		FAM	HEX
В-	Экстракция (выделение) РНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
К-	ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата
К+	ПЦР	Ниже порогового значения	Выше порогового значения положительного результата
ВК+	ПЦР	Выше порогового значения	Ниже порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

- 1. Если в положительном контроле ПЦР (К+) по каналу HEX отсутствует положительный сигнал требуется повторная амплификация всех отрицательных образцов.
- 2. Если в отрицательном контроле (В- или К-) по каналу HEX детектируется положительный сигнал, необходимо повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1-swine* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50 F – комплект реагентов для ПЦР-амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

19
M62

ВАРИАНТ FRT

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, амплификации и идентификации РНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО <i>Influenza virus A/H1-swine-rec</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 200 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки

151

ВАРИАНТ FRT

ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,1	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ТМ-Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	4 пробирки
ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
ПКО <i>Influenza virus A/H1-swine-rec</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

При использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT и «ПЦР-комплекта» вариант FRT 50 F ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

При использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT 60 F и «ПЦР-комплекта» вариант FRT 200 F ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического

материала на наличие РНК вируса гриппа *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Проводят при помощи:

- комплекта реагентов «РИБО-сорб» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией к комплекту.

ВНИМАНИЕ! Объем добавляемого ВКО STI-rec – 10 мкл.

- комплекта реагентов «РИБО-преп» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией к комплекту;
- автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» (производства «bioMérieux», Франция) с использованием протоколов указанных в «Методических рекомендациях по проведению экстракции РНК/ДНК при использовании автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» для последующего применения набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL».

ВНИМАНИЕ! Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-rec. В качестве отрицательного контроля экстракции (В-) используют ОКО. Для «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F и вариант FRT 200 F дополнительно используют ПКО *Influenza virus A/H1-swine-rec* в качестве положительного контроля экстракции (В+).

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

При использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT и и «ПЦР-комплекта» вариант FRT 50 F реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» – кат.№№ КЗ-4-100, КЗ-4-50, содержащий RT-G-mix-1 – или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ /ОТ-ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! На этапе амплификации используются положительные контроли: **ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine*** и **ПКО STI-88** которые предназначены для контроля правильности измерения значений на канале **Yellow/JOE/HEX** (ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine*) и на канале **Green/FAM** (ПКО STI-88); и отрицательный контроль – **ТЕ-буфер/РНК-буфер**, который предназначен для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора.

В каждом эксперименте, независимо от количества исследуемых клинических образцов, добавляется два контрольных образца (отрицательный и положительный) на этапе экстракции РНК, и три контрольных образца – на этапе амплификации/ОТ-ПЦР.

А. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-) -** внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+) -** внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine***.
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+) -** внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (выделения) (В-) –** внести в пробирку **10 мкл пробы, выделенной из ОКО**.
5. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 3).

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009)

Приборы роторного типа ¹				Приборы планшетного типа ²		
Цикл	Темпера-тура, °С	Время	Число повторов циклов	Темпера-тура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/Yellow/HEX (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

- 6. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- 7. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 8. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50 F

- 1. Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT (F) *Influenza virus A/H1-swine*, ПЦР-смесью-2-FRT и полимеразой (TaqF). Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT (F) *Influenza virus A/H1-swine*, ПЦР-смесью-2-FRT и полимеразой (TaqF) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
- 2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
- 3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке 10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FEP/FRT (F) *Influenza virus A/H1-swine*, 5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF).
- 4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе, и осадить капли

¹ например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные

² например, «ДТ-96» или аналогичные

ВАРИАНТ FRT

- кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
- 5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
 - 6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК**.
 - 7. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-) -** внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+) -** внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine***.
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+) -** внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (выделения) (В-) –** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.
 - 8. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу.
 - 9. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 4 и табл. 5).

3	15	150	3
	45	150	
		250	
2	64	датчики флуоресценции	42
	72	250	

Таблица 4

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009)

Приборы роторного типа ³				Приборы планшетного типа ⁴		
Цикл	Темпера- тура, °С	Время	Число повторов циклов	Темпера- тура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	25 с	

Таблица 5

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A/H1N1*(sw2009) для прибора «SmartCycler» («Cepheid», США)

Цикл	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	900 с	1
2	95	15 с	42
	54	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/Yellow/HEX/Cy3.

- 10. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- 11. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 12. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Проведение ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F и «ПЦР-комплект» вариант FRT 200 F

- 1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед

³ например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные
⁴ например, «ДТ-96» или аналогичные

проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице (см. приложение 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца РНК необходимо проводить постановку двух контролей этапа ОТ-ПЦР. Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования реагентов.

2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов РНК и кДНК. Тип пробирок, стрипов или планшетов выбрать в зависимости от используемого прибора. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной реакционной смеси.
3. В пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл РНК-проб** выделенных из клинических или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine***.
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (выделения) (В-)** – внести в пробирку **10 мкл пробы, выделенной из ОКО**.
 - д) **положительный контроль экстракции (выделения) (В+)** – внести в пробирку **10 мкл пробы, выделенной из ПКО *Influenza virus A/H1-swine-rec***.
5. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 6).

Таблица 6

Программа для проведения ОТ-ПЦР РНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)*

Приборы роторного типа ⁵				Приборы планшетного типа ⁶		
Цикл	Темпера-тура, °С	Время	Число повторов циклов	Темпера-тура, °С	Время	Число повторов циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	20 с	
	72	10 с		72	10 с	
4	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE. Каналы ROX и Cy5 включаются при необходимости, если проводятся тесты в формате «мультипрайм», для которых используются эти каналы.

- 6. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- 7. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 8. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов поводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора JOE/HEX/Cy3 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента РНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)*,
- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО STI-rec.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне

⁵ например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные
⁶ например, «Mx3000P», «Mx3000», «ДТ-96» или аналогичные

пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **РНК Influenza virus A/H1N1(sw2009) обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE/Yellow/HEX/Cy3 определено значение порогового цикла Ct, не превышающее максимальное значение, указанное во вкладыше. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **РНК Influenza virus A/H1N1(sw2009) не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE/Yellow/HEX/Cy3 не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM/Green определено значение порогового цикла Ct, не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора JOE/Yellow/HEX/Cy3, и по каналу для флуорофора FAM/Green значение Ct также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести исследование соответствующего клинического образца начиная с этапа выделения.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие РНК вируса гриппа *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct	
		по каналу для флуорофора FAM/Green	по каналу для флуорофора JOE/Yellow/Cy3
B-	Экстракция (выделение) РНК	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует
B+	Экстракция (выделение) РНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
BK+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует

ВНИМАНИЕ!

1. Если в положительном контроле экстракции РНК (B+) (при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FRT 60 F и вариант FRT 200 F) и в положительном контроле амплификации/ОТ-ПЦР (K+) по каналу JOE/Yellow/HEX/Cy3 отсутствует положительный сигнал, требуется повторная амплификация всех отрицательных образцов.
2. Если в отрицательном контроле выделения (B-) по каналу JOE/Yellow/HEX/Cy3, а в отрицательном контроле амплификации/ОТ-ПЦР (K-) - по каналу JOE/Yellow/HEX/Cy3 и FAM/Green детектируется положительный сигнал, необходимо повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК/РНК.
3. Если в исследуемых образцах значение «Ct» по каналу JOE/Yellow/HEX/Cy3 превышает максимальное, указанное во вкладыше, то результат анализа считается **сомнительным**, необходимо провести дополнительное исследование данного образца РНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения «Ct» – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

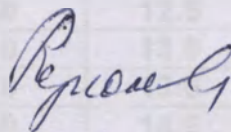
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT 50 F, «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F и «ПЦР-комплект» вариант FRT 200 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, ПЦР-смесь-2-FRT, ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Influenza virus A/H1-swine (объемом 0,6 и 1,1 мл), ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) Influenza virus A/H1-swine, ТМ-Ревертазу (MMIv) и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

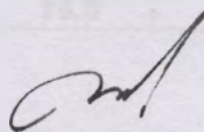
Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний



Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

для «ПЦР-комплект» вариант FRT 60 F и «ПЦР-комплект» вариант FRT 200 F

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10.00	5.00	0.25	0.50	0.25
Число исследуемых образцов ⁷	Число реакций ⁸	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	RT-G-mix-2	Полимераза (TaqF)	ТМ-Ревертаза (MMIv)
3	6	60	30	1.5	3.0	1.5
5	8	80	40	2.0	4.0	2.0
7	10	100	50	2.5	5.0	2.5
9	12	120	60	3.0	6.0	3.0
11	14	140	70	3.5	7.0	3.5
13	16	160	80	4.0	8.0	4.0
15	18	180	90	4.5	9.0	4.5
17	20	200	100	5.0	10.0	5.0
19	22	220	110	5.5	11.0	5.5
21	24	240	120	6.0	12.0	6.0
23	26	260	130	6.5	13.0	6.5
25	28	280	140	7.0	14.0	7.0
27	30	300	150	7.5	15.0	7.5
29	32	320	160	8.0	16.0	8.0
31	34	340	170	8.5	17.0	8.5
33	36	360	180	9.0	18.0	9.0
35	38	380	190	9.5	19.0	9.5
37	40	400	200	10.0	20.0	10.0
39	42	420	210	10.5	21.0	10.5
41	44	440	220	11.0	22.0	11.0
43	46	460	230	11.5	23.0	11.5
45	48	480	240	12.0	24.0	12.0
47	50	500	250	12.5	25.0	12.5
49	52	520	260	13.0	26.0	13.0
51	54	540	270	13.5	27.0	13.5
53	56	560	280	14.0	28.0	14.0
55	58	580	290	14.5	29.0	14.5
57	60	600	300	15.0	30.0	15.0

⁷ число клинических образцов и контроли этапа выделения РНК (N+2)

⁸ число клинических образцов, контроли этапа выделения РНК и контроли этапа ОТ-ПЦР (N+2+3)

163
Директор учреждения российской академии
медицинских наук научно-исследовательский
институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова РАМН
доктор биологических наук, профессор
академик РАМН

В.В. Зверев

Экспертное заключение
№ 65Э-09 от 7 декабря 2009 г.

По результатам экспертизы документации на изделие медицинского назначения,
заявленного к регистрации в Российской Федерации

Наименование и адрес экспертной организации	Учреждение российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН (НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН) 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а
Полномочия экспертной организации Росздравнадзора	Договор № 12-С/07 от 24.09.07. «О сотрудничестве с научными и иными организациями при проработке вопросов, отнесенных к установленной сфере деятельности Росздравнадзора» и дополнительное соглашение к нему № 1 от 01.04.08.
Наименование изделия	Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Influenza virus A/H1-swine-FL</i> ».
Тип/модель изделия	Набор реагентов «АмплиСенс® <i>Influenza virus A/H1-swine-FL</i> ».
Вид изделия	Изделие медицинского назначения
Организация-заявитель, страна, адрес, телефон, факс, E-mail, сайт	ФГУН ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел (495) 672-10-69, факс (495) 304-22-09, E-mail: info@pcr.ru
Организация-изготовитель, страна, адрес, телефон, факс, E-mail, сайт	ФГУН ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел (495) 672-10-69, факс (495) 304-22-09, E-mail: info@pcr.ru
Основание для проведения экспертизы	Договор 65Э-09 от 17.11.2009 г. между ФГУН ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА и НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН.
Цель проведения экспертизы	Оценка качества, эффективности, безопасности изделия медицинской техники и возможности его применения в медицинской практике на территории Российской Федерации после внесения изменений.

1. ОБЩИЕ ДАННЫЕ

1.1. Наименование изделия: Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*».

1.2 Тип/модель изделия: ИМН Набор реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*».

1.3. Назначение: Набор реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» предназначен для выявления вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) выделенной из клинического материала (мазки из полости носа и ротоглотки, мокрота (либо аспираты из носоглотки и трахеи), секционного материала (фрагменты пораженной части легких) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов обнаруживает фрагмент гена гемагглютинина вирусов гриппа А/Н1N1 Северо-Американской линии. Набор выпускается в двух вариантах: вариант FEP (выпускается в четырех формах комплектации) и вариант FRT (выпускается в четырех формах комплектации). Формы комплектации 1 - 4 варианта FEP предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации 1 и 2 варианта FRT предназначены для проведения ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа вместе с формами комплектации 1 - 4 варианта FEP и формами комплектации 1 и 2 варианта FRT необходимо использовать комплекты реагентов для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА. Формы комплектации 3 и 4 варианта FRT предназначены для проведения обратной транскрипции и амплификации кДНК в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования вместе формами комплектации 3 и 4 варианта FRT необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА. Используемые в наборе контрольные образцы позволяют контролировать процесс выделения ДНК и реакцию амплификации ДНК. Аналитическая чувствительность набора составляет 1×10³ копий/мл РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) при использовании вариантов комплектации набора FEP и FRT в сочетании с комплектом для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» и 5×10³ копий/мл РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) при использовании вариантов комплектации набора FEP и FRT в сочетании с комплектом для выделения РНК/ДНК «РИБО-сорб».

1.4. Область применения: «клиническая лабораторная диагностика».

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.

Технические требования, описанные в Технических условиях 9398-101-01897593-2009, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и нормы
1	2
1. Внешний вид	
1.1. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость *

1.2. ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость *
1.3. ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость
1.4. Минеральной масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость
1.5. . ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость
1.6. ПКО STI	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета
1.7. ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i> - кус	Прозрачная бесцветная жидкость
1.8. ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.9. ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость
1.10. ПЦР-смесь-1 FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A/H1-swine</i>	Прозрачная бесцветная жидкость
1.11. . ПЦР-смесь-2-FRT (F)	Прозрачная бесцветная жидкость
1.12. Воск для ПЦР	Прозрачная бесцветная жидкость
1.13. RT-G-mix-2	Прозрачная бесцветная жидкость
1.14. ОТ-ПЦР-смесь-2- FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость
1.15. Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость
1.16. ТМ-Ревертаза (MMIv)	Бесцветная вязкая жидкость
1.17. РНК-буфер	
1.18. ТЕ-буфер	
2. Технические характеристики (чувствительность и специфичность)	
2.1. Чувствительность	
2.1.1 Разведения стандартного образца предприятия № 66 «Положительный контрольный образец содержания кДНК вируса гриппа A/H1-swine (СОП ПКО кДНК <i>Influenza virus A/H1-swine</i>)» с концентрацией не менее 1×10^3 копий/мл при выделении РНК комплектом реагентов «РИБО-преп» и не менее 5×10^3 копий/мл при выделении РНК комплектом реагентов «РИБО-сорб»	Наличие флуоресцентного сигнала
2.2. Специфичность	
3.2.1. Отрицательные контрольные образцы - ОКО, ТЕ-буфер, РНК-буфер.	Отсутствие флуоресцентного сигнала

3.1. Потенциальный риск применения набора по ГОСТ Р 51609-2000 – класс 3.

3. СОСТАВ ИЗДЕЛИЯ:

Набор выпускается в двух вариантах.

3.1. **Вариант FEP** выпускается в четырех формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP 50;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP 200;

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0.5 мл);

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0.2 мл);

3.1. **Вариант FRT** выпускается в четырёх формах комплектации

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50F;

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 60F;

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 200F;

Комплекты реагентов, используемые в комплектации наборов:

«ПЦР-комплект» вариант FEP 50 – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» включает:

1. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine* – 5 пробирок (по 0,12 мл);
2. ПЦР-смесь-2-FL – 1 пробирка (0,77 мл);
3. Минеральное масло для ПЦР – 1 флакон (4,0 мл);
4. Воск для ПЦР - 1 пробирка (1,70 мл);
5. ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine* – 1 пробирка (0,1 мл).
6. ПКО STI – 1 пробирка (0,1 мл);
7. ТЕ-буфер - 1 пробирка (0,5 мл);

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

1. ОКО – 2 пробирки по (1,2 мл);
2. ВКО STI-rec – 5 пробирок (по 0,12 мл);

«ПЦР-комплект» вариант FEP - 200 комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» включает:

1. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine* – 4 пробирки (по 0,12 мл);
2. ПЦР-смесь-2-FL – 4 пробирка (по 0,77 мл);
3. ПЦР-смесь-2-Фон – 1 пробирка (0,5 мл);
4. Минеральное масло для ПЦР – 1 флакон (4,0 мл);
5. ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine* – 1 пробирка (0,1 мл).
6. ПКО STI – 1 пробирка (0,1 мл);
7. ТЕ-буфер - 1 пробирка (0,5 мл);

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

1. ОКО – 2 пробирки по (1,2 мл);
2. ВКО STI-rec – 5 пробирок (по 0,12 мл);

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», включает:

1. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus A/H1-swine*, раскапана под воск – 55 пробирок (по 0,008 мл);
2. ПЦР-смесь-2-FL – 1 пробирка (0,77 мл);
3. ПКО кДНК *Influenza virus A/H1-swine* – 1 пробирка (0,1 мл).
6. ПКО STI – 1 пробирка (0,1 мл);
7. ТЕ-буфер - 1 пробирка (0,5 мл);

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

1. ОКО – 1 пробирка по (1,2 мл);
2. ВКО STI-rec – 5 пробирок (по 0,12 мл);

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 50F – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A/H1N1(sw2009)* с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», включает:

1. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus* A/H1-swine, раскапана под воск – 5 пробирок (по 0,12 мл);
2. ПЦР-смесь-2-FL – 1 пробирка (0,3 мл);
3. Полимераза (TaqF) - 1 пробирка (0,03 мл);
4. ПКО кДНК *Influenza virus* A/H1-swine – 1 пробирка (0,1 мл).
5. ПКО STI – 1 пробирка (0,1 мл);
6. TE-буфер - 1 пробирка (0,5 мл);

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

1. ОКО – 1 пробирка по (1,2 мл);
2. ВКО STI-rec – 5 пробирок (по 0,12 мл);

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 60F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, амплификации идентификации РНК *Influenza virus* A/H1N1(sw2009) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», включает:

1. RT-G-mix-2 - 1 пробирка (0,015 мл);
2. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus* A/H1-swine, раскапана под воск – 1 пробирка (0,6 мл);
3. ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT – 1 пробирка (0,3 мл);
4. Полимераза (TaqF) - 1 пробирка (0,03 мл);
5. ТМ-ревертаза (MMlv)- 1 пробирка (0,015 мл);
6. ПКО кДНК *Influenza virus* A/H1-swine – 1 пробирка (0,1 мл).
7. ПКО STI – 1 пробирка (0,1 мл);
8. РНК-буфер - 1 пробирка (0,6 мл);

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

1. ОКО – 1 пробирка (по 1,2 мл);
2. ПКО кДНК *Influenza virus* A/H1-swine – 2 пробирки (0,1 мл).
3. ВКО STI-rec – 1 пробирка (0,5 мл);

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT 200F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК, амплификации идентификации РНК *Influenza virus* A/H1N1(sw2009) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», включает:

1. RT-G-mix-2 - 4 пробирки (по 0,015 мл);
2. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus* A/H1-swine – 2 пробирки (ар 1,1 мл);
3. ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT – 2 пробирки (по 0,6 мл);
4. Полимераза (TaqF) - 2 пробирка (по 0,06 мл);
5. ТМ-ревертаза (MMlv)- 4 пробирка (по 0,015 мл);
6. ПКО кДНК *Influenza virus* A/H1-swine – 2 пробирка (по 0,1 мл).
7. ПКО STI – 2 пробирка (по 0,1 мл);
8. РНК-буфер - 2 пробирки (по 0,6 мл);

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

1. ОКО – 2 пробирка (по 0,5 мл);
2. ПКО кДНК *Influenza virus* A/H1-swine – 4 пробирки (по 0,1 мл).
3. ВКО STI-rec – 2 пробирки (по 1,0 мл);

Один набор в зависимости от формы комплектации предназначен для проведения 55 тестов (формы комплектации 1,2 и 4 варианта FEP, формы комплектации 1 и варианта FRT), 220 реакций амплификации (формы комплектации 2 варианта FEP), 60 реакций обратной транскрипции и амплификации (форма комплектации варианта FRT), 70 реакций амплификации (форма комплектации 2 варианта FRT), 220 реакций обратной транскрипции и амплификации (форма комплектации варианта FRT), включая контроли.

3.3. В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению;
- паспорт;
- вкладыш к «ПЦР-комплекту»;
- методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие РНК вируса гриппа *Influenza virus* A/H1N1(sw2009) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

4. НА ЭКСПЕРТИЗУ ПРЕДСТАВЛЕНО:

4.1. Письмо от 16 ноября 2009 г. № 03/1098 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора с просьбой провести экспертизу пакета документов для внесения изменений в регистрационную документацию на набор реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL».

4.2. Заявление от 17 ноября 2009 г. ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в адрес руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития с просьбой внести изменения в регистрационную документацию на изделие медицинского назначения (ИМН) Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL».

4.3. Справка об изделии медицинского назначения Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL».

4.4. Отчет о проведении ускоренного хранения набора реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL».

4.5. Паспорт качества на серию № 05.11.09 Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL» Вариант FEP Форма 2.

4.6. Паспорт качества на серию № 03.11.09 Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL» Вариант FEP Форма 2.

4.7. Паспорт качества на серию № 06.11.09 Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL» Вариант FEP Форма 3.

4.8. Паспорт качества на серию № 03.11.09 Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus* A/H1-swine-FL» Вариант FRT Форма 1.

- 4.9 Паспорт качества на серию № 05.11.09 Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Вариант FRT Форма 2.
- 4.10. Паспорт качества на серию № 6.11.09 Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Вариант FRT Форма3.
- 4.11. ВКЛАДЫШ к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» «ПЦР-комплект» вариант FRT 50F серии 03.11.09.
- 4.12. ВКЛАДЫШ к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» «ПЦР-комплект» вариант FRT 60F, вариант FRT 200F серии 06.11.09.
- 4.13. ВКЛАДЫШ к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» «ПЦР-комплект» вариант FRT 60F, вариант FRT 200F серии 05.11.09.
- 4.14. ВКЛАДЫШ к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» «ПЦР-комплект» вариант FEP, вариант FEP 50, вариант FEP 200 серии 03.11.09.
- 4.15. ВКЛАДЫШ к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» «ПЦР-комплект» вариант FEP, вариант FEP 50, вариант FEP 200 серии 06.11.09.
- 4.16. ВКЛАДЫШ к набору реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» «ПЦР-комплект» вариант FEP, вариант FEP 50, вариант FEP 200 серии 05.11.09.
- 4.17. Инструкция по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*». (копия)
- 4.18. ТУ 9398-100-01897593-2009 на Набор реагентов для идентификации вируса гриппа свиней А/Н1 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*». (копия)
- 4.19. ТУ 9398-101-01897593-2009 на Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*». (копия)
- 4.20. Экспертное заключение ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича на Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» от 11 ноября 2009 г. (копия)
- 4.21. Результаты контроля в ГИСК им. Л.А. Тарасевича «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией вариант FRT, форма комплектации 1, серия 03.11.09, срок годности до 03.08.10 (копия).
- 4.22. Результаты контроля в ГИСК им. Л.А. Тарасевича «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией вариант FRT, форма комплектации 3, серия 06.11.09, срок годности до 06.08.10 (копия).
- 4.23. Результаты контроля в ГИСК им. Л.А. Тарасевича «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией вариант FRT, форма комплектации 2, серия 05.11.09, срок годности до 05.08.10 (копия).
- 4.24. Результаты контроля в ГИСК им. Л.А. Тарасевича «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в

клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией вариант FEP, форма комплектации 1, серия 03.11.09, срок годности до 03.08.10 (копия).

4.25. Результаты контроля в ГИСК им. Л.А. Тарасевича «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией вариант FEP, форма комплектации 3, серия 06.11.09, срок годности до 06.08.10 (копия).

4.26. Результаты контроля в ГИСК им. Л.А. Тарасевича «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией вариант FEP, форма комплектации 2, серия 05.11.09, срок годности до 05.08.10 (копия).

5. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ПРЕДСТАВЛЕННЫХ СОПРОВОДИТЕЛЬНЫХ ДОКУМЕНТОВ.

В результате анализа представленных сопроводительных документов было установлено:

1) Название изделия и область применения соответствуют предусмотренному назначению. Все компоненты набора реагентов выпускаются готовы к использованию. Срок годности набора – 9 месяцев. Набор реагентов» транспортируют при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT 50F, «ПЦР-комплект» вариант FRT 60F и «ПЦР-комплект» вариант FRT 200F при получении разуконплектовывают и хранят в соответствии с указанными в инструкции по применению набора температурами хранения.

2). Вносимые изменения обусловлены изменением наименования ИМН: заменой некорректного полного названия патогенного для человека вируса гриппа - «грипп свиней» на «грипп A/H1N1(sw2009)», - а также увеличением комплектации и расширением приборной базы набора.

3) Экспертиза нормативной документации на набор и испытания серий набора «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*», проведенные в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, показали, что предлагаемые авторами изменения касаются введения дополнительных (к уже используемой форме комплектации в 55 пробирках) форм комплектации реагента ПЦР-смесь-1-FEP/FRT в одной пробирке («нераскапанная» форма), что вызвано необходимостью сокращения времени производства и увеличения количества определений с 55 анализов до 220 в одном наборе. Качество испытанных серий набора соответствовало требованиям ТУ9398-101-01897593-2009. Название набора реагентов «Набор реагентов для **идентификации вируса гриппа свиней A/H1** методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» заменено на «Набор реагентов для **выявления РНК вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в клиническом материале** методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*», поскольку набор позволяет выявлять патогенный для человека вирус гриппа A/H1N1(sw2009). Проведенные испытания показали, что вносимые изменения не влияют на качество набора и методы его контроля. и могут быть рекомендованы для внесения в ТУ и Инструкцию по применению набора.

4) Классификация изделия:

- класс потенциального риска применения набора – класс 3;
- код ОКП 93 9816;
- вид изделия: изделие медицинского назначения.

6. РЕКОМЕНДАЦИИ О НЕОБХОДИМОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

В результате анализа представленной документации можно сделать заключение, что необходимости в проведении дополнительных испытаний для внесения изменений в регистрационную документацию на набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия нет.

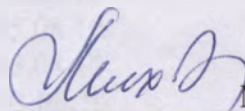
7. ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗДЕЛИЯ В СИСТЕМЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» может быть использован для быстрой идентификации новых пандемических штаммов вируса гриппа А/Н1N1.

8. РЕКОМЕНДАЦИИ О ВОЗМОЖНОСТИ (НЕВОЗМОЖНОСТИ) РЕГИСТРАЦИИ ИЗДЕЛИЯ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

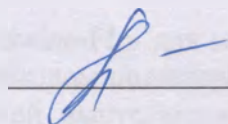
Изделие медицинского назначения Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A/H1-swine-FL*» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия рекомендуется для регистрации и применения в системе здравоохранения Российской Федерации.

Зам. директора по научной работе
НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН
д.м.н., профессор



Михайлова Н.А.

Ведущий научный сотрудник
НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН
к.б.н.



Алаторцева Г.И.

Экспертное заключение

№ 657 от 7.12.2009,

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено печатью 9 листов

Зам. директора

По науке

Михайлова Н.

