

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 28.09.2009 № 7528-17п/09

«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

«15» сентября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и

идентификации субтипа H5N1 в биологическом

материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс[®] *Influenza virus A H5N1-FL*»

ОГЛАВЛЕНИЕ.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.....	3
СОСТАВ.....	4
НАЗНАЧЕНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.....	15
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПРОБ.....	15
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, ПЦР- АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.....	18
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.....	27
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	27

Набор реагентов выпускается в 2 вариантах.

Вариант FEP.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

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).

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3 и 4** гарантируются только в случае применения дополнительных комплектов реагентов «РИБО-сорб» и «РЕВЕРТА-L» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

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

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3 и 4** гарантируются только в случае применения дополнительных комплектов реагентов «РИБО-сорб» и «РЕВЕРТА-L» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ¹	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ¹	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 (ТУ 9398-005-01897593-2008) - комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	5 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл

¹ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
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</i>	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 «ПЦР-комплект» вариант FEP прилагаются следующие реактивы:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	3 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Реагенты для идентификации субтипа H5N1 *Influenza virus A*:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> H5N1 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H5	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> N1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i>	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 «ПЦР-комплект» вариант FRT прилагаются следующие реактивы:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	3 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Реагенты для идентификации субтипа H5N1 *Influenza virus A*:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H5N1</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H5</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A N1</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F - комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT (SC) <i>Influenza virus A</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПЦР-буфер-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F прилагаются следующие реактивы:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	3 пробирки

ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
-------------	--------------------------------	------	------------

Реагенты для идентификации субтипа H5N1 *Influenza virus A*:

Реактив	Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT (SC) <i>Influenza virus A H5N1</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H5</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A N1</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *Influenza virus A H5N1-FL*» предназначен для выявления РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и идентификации субтипа H5N1 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Вариант FEP. Формы комплектации **1** и **2** предназначены для полного анализа, включая выделение РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации **3** и **4** предназначены для проведения ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) для выделения ДНК из клинического материала и «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008) для получения кДНК на матрице РНК производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT. Формы комплектации **1** и **2** предназначены для полного анализа, включая выделение РНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Формы комплектации **3** и **4** предназначены для проведения ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) для

выделения РНК из клинического материала и «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008) для получения кДНК на матрице РНК производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 5×10^3 копий/мл.

ВЗЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Для исследования используется следующий материал.

Материал от людей:

- мазки из полости носа и ротоглотки;
- смывы из полости носа и ротоглотки;
- аспират из трахеи;
- фекалии;
- секционный материал.

Взятие мазков из полости носа.

Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков» (производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Взятие мазков из ротоглотки.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую

пробирку с 500 мкл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-08) производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

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 и исследуются как один образец.

Получение смывов из полости носа.

Манипуляции производят в положении больного сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью зонда или одноразового шприца вводят по 3-5 мл теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования.

Получение смывов из ротоглотки.

Перед манипуляцией необходимо предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10-15 с) 8-10 мл изотонического раствора натрия хлорида. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования.

Фекалии.

Используют пробы фекалий массой (объемом) 1-3 г (1-3 мл). Фекалии забирают из предварительно продезинфицированного горшка или подкладного судна. Пробу в количестве 1 грамма (примерно) отдельным наконечником с аэрозольным барьером или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон.

Секционный материал.

Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия либо

исследуют в течение 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течение 1 года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Материал от животных:

При исследовании птиц:

- помет (4-5 г) в стерильных контейнерах (например, ООО «ИнтерЛабСервис», ИЛС-КП-60-С);
- мазки из клоаки, со слизистой глотки и трахеи берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков» (производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), стерильного физиологического раствора (0,9% раствор NaCl) или раствора фосфатного буфера (натрий хлорид, 137 мМ, калий хлорид, 2,7 мМ, натрий монофосфат, 10 мМ, калий дифосфат, 2 мМ; рН 7,5±0,2. Фосфатный буфер хранят в полипропиленовом флаконе с плотно закрытой крышкой при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 года). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают;
- трахеальные смывы получают с помощью стерильного физиологического раствора.

При исследовании других павших животных

- внутренние органы (фрагменты трахеи и легких) в одноразовых стерильных контейнерах.

Допускается **хранение** вышеперечисленного **материала** до проведения исследования **в течение 1 сут** при температуре **от 2 до 8 °С** или **1 нед** – при температуре **не выше минус 16 °С**.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с рекомендациями МУК 4.2.2136 – 06 «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высококовирулентными штаммами

вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей» и требованиями СП 1.3.1285 –03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся дозаторами переменных объемов с использованием одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и 10,0 мл и наконечников с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т и утилизироваться в соответствии с вышеуказанными документами.

Мазки и смывы используются без предварительной обработки.

Аспират из трахеи. Дополнительно требуется реагент «МУКОЛИЗИН» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (50 мкл) используют для выделения РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Секционный материал и внутренние органы животных 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 30 с. Надосадочную жидкость используют для выделения РНК.

Фекалии людей.

При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий в виде прозрачной жидкости фекальную суспензию не готовят).

Приготовление фекальной суспензии:

В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 0,8 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида).

В каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл)

фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение 1 сут и/или необходимости длительного хранения к 10-20 % суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10-15 %. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30-40 мин.

Приготовление осветленного экстракта фекалий:

Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином.

Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе и переносят в эппендорф.

Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 10 тыс g (12 тыс об/мин) в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для выделения РНК.

Помет.

Для исследования используют 4-5 г помета. Готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе, тщательно ресуспендируют и декантируют в течение 10 мин. Надосадок переносят в эппендорф и центрифугируют при 12 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для выделения РНК.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

- 1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.**
- 2. Работать в средствах индивидуальной защиты предусмотренных в МУК 4.2.2136 – 06 «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высококовирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей» (в том числе в одноразовых**

перчатках), использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т

3. Анализ проводится согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности», СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».
4. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
5. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР-амплификации, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения РНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
4. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ЗОНА 2.

Для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, а также гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:
(с указанием фирм-производителей / поставщиков)

Вариант FEP: амплификатор, адаптированный для ПЦР-пробирок 0,5 мл, например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия, или амплификатор, адаптированный для ПЦР-пробирок 0,2 мл, например, «Gradient Palm Cyclер» («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный. Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентный.

Вариант FRT: амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000, («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «iQiCyclер» («BioRad», США), «SmartCyclер II» («Cepheid», США) или эквивалентный.

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл

(плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок.

Для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQiCycler»). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США).

Для приборов для ПЦР в реальном «SmartCycler II». Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 25 мкл реакционной смеси («Cepheid», США). Центрифуга «MiniSpin» и штатив для пробирок («Cepheid», США).

Для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл («Gradient Palm Cycler», «GeneAmp PCR System 2700» и др.). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Ахуген», США).

Для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Ахуген», США).

3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
6. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала).

Объем исследуемого материала для выделения РНК – 0,05 мл.

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «Rnase-free», «Dnase-free».

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора**, по **10 мкл ВКО STI-rec** и по **50 мкл ОКО**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором, ВКО STI-rec** и **ОКО** внести по **50 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. Перемешать пипетированием.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **50 мкл ОКО**.
5. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Инкубировать при комнатной температуре от 3 до 5 мин. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
6. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
7. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**.

Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя пункту **9**.
11. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
13. В пробирки добавить по **40 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с аэрозольным барьером, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции.

Реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С. Для длительного хранения препарата необходимо отобрать раствор РНК, не захватывая сорбент, перенести в стерильную пробирку и хранить в течение года при температуре

не выше минус 68 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ, ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации).

I. Проведение реакции обратной транскрипции.

(Общий объем реакции – 20 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл).

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «Rnase-free», «Dnase-free».

Порядок работы:

1. Отобрать необходимое количество микропробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **RT-mix** внести **5 мкл RT-G-mix-1** и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMIv)**, пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. Внести в микропробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечник с барьером, добавить **10 мкл РНК-пробы** в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) при температуре 37 °С на 30 мин.
7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к **20 мкл кДНК** отдельным наконечником с барьером добавить **20 мкл ДНК-буфера**, перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с на вортексе для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не

выше минус 68 °С в течение года.

II. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(Общий объем реакции – 25 мкл, объем кДНК-пробы – 10 мкл).

Вариант FEP.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Выявление РНК *INFLUENZA VIRUS A*.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A* 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*.
3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).
4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A* на поверхность застывшего воска внести 17 мкл ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A*. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР.
5. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольным барьером, внести по 10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
6. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль (К-) – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) положительный контроль (К+) – внести в пробирку

10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A*.

Б. Проведение амплификации.

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

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

Таблица 1.

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A*

цикл	Для амплификаторов с активным регулированием ² температуры			Для амплификаторов с активным регулированием ³ температуры			Для амплификаторов с матричным регулированием ⁴ температуры		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	25 с	42
	54 °С	10 с		54 °С	25 с		54 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение	

2. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции результатов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СУБТИПА Н5N1 INFLUENZA VIRUS A.

Для идентификации субтипа Н5N1 используют образцы кДНК, полученные после реакции обратной транскрипции.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A* Н5N1 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* Н5N1.
3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР

² Например, «Терцик» («ДНК-технология»)

³ Например, «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «MyCycler» («BioRad»)

⁴ Например, «Uno-2» («Biometra»)

- (примерно 25 мкл).
4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A H5N1* на поверхность застывшего воска внести 17 мкл ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A H5N1*. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР.
 5. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольным барьером, внести по 10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
 6. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль (К-) – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) положительный контроль (К₅ тип) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A H5*;
 - в) положительный контроль (К_{N1} тип) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A N1*.

Б. Проведение амплификации.

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

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

Таблица 2.

Программа амплификации кДНК *Influenza virus A H5N1*

цикл	Для амплификаторов с активным регулированием ² температуры			Для амплификаторов с активным регулированием ³ температуры			Для амплификаторов с матричным регулированием ⁴ температуры		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	25 с	42
	54 °С	10 с		54 °С	25 с		54 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение	

2. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции результатов.

*Внимание! Перед работой необходимо ознакомиться с инструкциями к приборам и «Методическими Рекомендациями по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и идентификации субтипа *H5N1* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A H5N1-FL*» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).*

Вариант FRT. Амплификаторы роторного и планшетного типов.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

ВЫЯВЛЕНИЕ РНК *INFLUENZA VIRUS A*.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A*** 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***.
3. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**;
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A***.

Б. Проведение амплификации.

1. Установить пробирки в реакционный модуль.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации для приборов роторного типа⁵

1. Hold/Удерж. Темп-ры 95 °С – 5 мин
2. Cycling/Циклирование 95 °С – 10 с
54 °С – 20 с
72 °С -10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
3. Cycling2/Циклирование2 95 °С – 10 с
54 °С – 20 с – Детекция
72 °С -10 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.
4. Флюоресценцию измеряют при **54 °С** (во втором блоке циклирования) на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow**.

Программа амплификации для приборов планшетного типа⁶

- 95 °С –5 мин
10 циклов: 95 °С – 10 с / 54 °С – 25 с /72 °С – 25 с
35 циклов: 95 °С – 10 с / 54 °С – 25 с (детекция) /72 °С – 25 с
детекция флуоресценции на 2-м шаге (54 °С) второго блока циклирования

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СУБТИПА H5N1 INFLUENZA VIRUS A.

Для идентификации субтипа H5N1 используют образцы кДНК, полученные после реакции обратной транскрипции.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Influenza virus A H5N1*** 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 H5N1***.
3. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции**

⁵ Например, «Rotor-Gene» 3000 и «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия)

⁶ Например, «iQ1Cycler» («BioRad», США)

РНК.

4. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль (К-) – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**;
 - б) положительный контроль (К⁺_{5 тип}) – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A H5***;
 - в) положительный контроль (К⁺_{N1 тип}) – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A N1***.

Б.Проведение амплификации.

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации для приборов роторного типа5

- | | |
|--|---|
| 1. Hold/Удерж. Темп-ры | 95 °С – 5 мин |
| 2. Cycling/Циклирование | 95 °С – 10 с
54 °С – 20 с
72 °С – 10 с |
| | Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз. |
| 3. Cycling2/Циклирование2 | 95 °С – 10 с
54 °С – 20 с – Детекция
72 °С – 10 с |
| | Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз. |
| 4. Флуоресценцию измеряют при 54 °С (во втором блоке циклирования) на каналах FAM/Green, JOE/Yellow . | |

Программа амплификации для приборов планшетного типа6

- 95 °С – 5 мин
- 10 циклов: 95 °С – 10 с / 54 °С – 25 с / 72 °С – 25 с
- 35 циклов: 95 °С – 10 с / 54 °С – 25 с (детекция) / 72 °С – 25 с
- детекция флуоресценции на 2-м шаге (54 °С) второго блока циклирования

Вариант FRT. Амплификатор «SmartCycler II» («Cepheid», США).

ВЫЯВЛЕНИЕ РНК INFLUENZA VIRUS A.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT (SC) *Influenza virus A*** (одна пробирка рассчитана на постановку 11 реакций). Перемешать на встряхивателе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FRT (SC) *Influenza virus A***, **5*(N+1) мкл ПЦР-буфера-Flu** и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**.
3. Перемешать **смесь** на встряхивателе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по **15 мкл** в микропробирки на 0,025 мл.
4. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
5. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**;
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A***.
6. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору Smart Cycler II.

Б. Проведение амплификации.

1. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации.

1. Stage1	Hold	95 °C – 900 с
2. Stage2	2-Temperature Cycle	95 °C – 15 с
		54 °C – 25 с
		72 °C – 25 с
		Repeat – 42

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СУБТИПА H5N1 INFLUENZA VIRUS A.

Для идентификации субтипа H5N1 используют образцы кДНК, давшие положительные результаты на наличие РНК *Influenza virus A* (с ПЦР-смесью-1-FRT (SC) *Influenza virus A*). (Общий объем реакции – 25 мкл, объем кДНК-пробы – 10 мкл).

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FRT (SC) *Influenza virus A H5N1* (одна пробирка рассчитана на постановку 11 реакций). Перемешать на встряхивателе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке $10*(N+1)$ мкл ПЦР-смеси-1-FRT (SC) *Influenza virus A H5N1*, $5*(N+1)$ мкл ПЦР-буфера-Flu и $0,5*(N+1)$ мкл полимеразы (TaqF).
3. Перемешать смесь на встряхивателе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в микропробирки на 0,025 мл.
4. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по 10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
5. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль (К-) – вместо кДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) положительный контроль (К⁺_{5 тип}) – в пробирку внести 10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A H5*;
 - в) положительный контроль (К⁺_{N1 тип}) – в пробирку внести 10 мкл ПКО кДНК *Influenza virus A N1*.
6. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору Smart Cycler II.

Б. Проведение амплификации.

1. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышки ячеек.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного

прибора.		
1. Stage1	Hold	95 °С – 900 с
2. Stage2	2-Temperature Cycle	95 °С – 15 с
		54 °С – 25 с
		72 °С – 25 с
		Repeat – 42

Внимание! Перед работой необходимо ознакомиться с инструкциями к соответствующим приборам и «Методическими Рекомендациями по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (Influenza virus A) и идентификации субтипа H5N1 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Influenza virus A H5N1-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий раствор ДП-2Т.

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. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

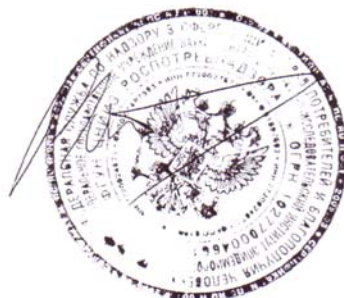
Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «ПЦР-комплект» (кроме ПЦР-смеси-1-FRT (SC) *Influenza virus A*, ПЦР-смеси-1-FRT (SC) *Influenza virus A H5N1* и полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L», ПЦР-смесь-1-FRT (SC) *Influenza virus A*, ПЦР-смесь-1-FRT (SC) *Influenza virus A H5N1* и полимеразу (TaqF) (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект») 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 H5N1-FL*» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя 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 адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН ЦНИИЭ
Роспотребнадзора



В.И.Покровский