

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор центра постгеномных технологий
федерального государственного
бюджетного учреждения «Центр
стратегического планирования и
управления медико-биологическими
рисками здоровью» Федерального медико-
биологического агентства (ФГБУ «ЦСП»

ФМБА России

Г.А. Шипулин

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления
РНК вируса гриппа А субтипа Н5
методом полимеразной цепной реакции
«АмплиТест® Influenza А Н5»

Для ветеринарной лабораторной диагностики и других немедицинских целей



ФГБУ «ЦСП» ФМБА России,
119121, Российская Федерация,
г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ.....	4
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ.....	4
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ	6
СОСТАВ.....	7
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК.....	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	21
ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	28
А. Подготовка проб для амплификации	28
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	29
В. Анализ и интерпретация результатов.....	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	33
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ВКО	- внутренний контрольный образец
ГА	- гемагглютинирующая активность
ГЭ	- геномный эквивалент – количество РНК-мишени (1 копия), содержащейся в 1 геноме вируса
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
НК	- нуклеиновые кислоты
ПК	- положительный контроль экстракции РНК, обратной транскрипции и ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР, не содержит фрагменты РНК вируса гриппа А
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция и ПЦР-амплификация
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГБУ «ЦСП» ФМБА России	- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
LD50/мл, ЛД50/мл	- средняя летальная доза, вызывающая гибель 50% животных

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа Н5 методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® Influenza А Н5» предназначен для качественного определения РНК вируса гриппа А субтипа Н5 в биологическом материале птиц (мазки из клоаки, ротоглотки, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек, аллантоисная жидкость эмбрионов птиц, мазки биологического материала на транспортных ФТА картах), а также в мазках с поверхности мяса и субпродуктов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Функциональное назначение – диагностика вируса птичьего гриппа А (*Influenza A*) субтипа Н5.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Выявление вируса гриппа А субтипа Н5 у сельскохозяйственных и диких птиц, диагностика высокопатогенного субтипа вируса гриппа Н5, в том числе клады 2.3.4.4b, имеющего высокую способность к реассоциации генома с геномами других субтипов вируса, для оперативного контроля в ситуациях, подозрительных на вспышку заболевания, и дифференциальной диагностики других основных заболеваний птиц.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов используется в ветеринарной лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от птиц с подозрением на птичий грипп, в том числе при вспышках данной инфекции.

Противопоказания к применению отсутствуют.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ

К работе с комплектом реагентов допускаются только работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО IC-R1), с проведением на следующем этапе исследования реакции обратной транскрипции РНК и одновременной амплификации участков кДНК вируса гриппа А субтипа Н5 и кДНК ВКО IC-R1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

ВКО IC-R1 позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние потенциальных ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью ревертазы и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

При исследовании одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции ОТ-ПЦР – амплификация кДНК вируса гриппа А субтипа Н5, а также амплификация последовательности кДНК ВКО IC-R1. Результаты амплификации регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции (см. табл.1).

Таблица 1 — Анализ результатов по каналам для флуорофоров

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	ВКО IC-R1	кДНК вируса гриппа А субтипа Н5
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	фрагмент гена гемагглютинина

КОМПЛЕКТНОСТЬ И СОСТАВ

Набор реагентов выпускается в двух формах комплектации.

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп ВЕТ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100.

Форма 2 включает комплекты реагентов «Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100.

Все формы комплектации набора реагентов предназначены для выполнения полного ОТ-ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», что позволяет определять РНК вируса гриппа А субтипа Н5 в качественном формате.

Набор реагентов рассчитан на анализ 100 образцов, включая контроли.

Комплектность:

- Набор реагентов «АмплиТест® Influenza А Н5»;
- Инструкция по применению;
- Краткое руководство;
- Вкладыш;
- Паспорт качества.

СОСТАВ

«РИБО-преп ВЕТ» вариант 100 – комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ¹	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

«РИБО-преп ВЕТ» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 1.

К комплекту реагентов «РИБО-преп ВЕТ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК InfA H5	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

«Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100 - комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий буфер Комбо	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ²	50	1 флакон
Буфер GT	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка

¹ При хранении при температуре от 2 до 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

² При хранении при температуре от 2 до 8°C возможно образование осадка в виде кристаллов.

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Магнитный сорбент	Суспензия коричневого цвета	1	2 пробирки
Раствор для отмывки Комбо-1	Прозрачная бесцветная жидкость	70	1 флакон
Раствор для отмывки Комбо-2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон

К комплекту реагентов «Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100 прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО IC-R1	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО РНК InfA H5	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

«Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы 2.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации фрагментов кДНК вируса гриппа А субтипа H5 в режиме «реального времени» включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL InfA H5	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ОТ-ПЦР-буфер-R	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Таq полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
Ревертаза (MMIv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций

обратной транскрипции и амплификации (всего 100 тестов), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиТест® Influenza A H5»

Вид исследуемого материала	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Мазки из клоаки, ротоглотки, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек, аллантоисная жидкость эмбрионов птиц, мазки биологического материала на транспортных ФТА картах, мазки с поверхности мяса и субпродуктов	1x10 ³

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК штаммов следующих микроорганизмов: штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm (A/C.-Петербург/НИИГ-94/20) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H2N3) (A/Утка/Германия-1215/73) (1x10^{5,5} LD50/мл), вируса гриппа А (H3N2) (A/Красноярск/НИИГ-20/21) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (A/Скворец/233/07/1/2011) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H5N1) (A/NIBRG/14) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H5N3) (A/duck/Moscow/4971/13) (1:256 ГА), вируса гриппа А (H7N3) (A/Mallard/NT/12/2002) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N7) (A/Equine/Corbora/5/1976) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H7N9) (A/Anhui/1/2013) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2) (A/НК/1073/1999) (1:128 ГА), вируса гриппа А (H9N2)

(А/Чирок/Колотун/Приморье/3628/2002) (1:32 ГА), вируса гриппа А (H10N5) (A/mallard/Dagestan/004/2018) (1:32 ГА), вируса гриппа В (В/С. Петер-бург/НИИГ-183/2020) вируса гриппа С (С/Taylor/1233/1947) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им А.С.Смородинцева; штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2 из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, № ГСО 11661-2020 (1×10^7 копий/мл); штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ($1,3 \times 10^7$ копий/мл) из коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

При тестировании вышеперечисленных образцов ложноположительных реакций (результатов) выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования по выявлению в биологическом материале возбудителей инфекционных болезней должно проводиться с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента

ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.

- Температура в помещениях лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

(пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится выделение НК, постановка ОТ-ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в

перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Зонд для взятия биологического материала из клоаки, ротоглотки, носоглотки и трахеи или сухие стерильные зонды с ватными тампонами.
2. Стерильный физиологический раствор.
3. Пробирки вакуумные для гематологии с 3 % раствором ЭДТА (например, ArxLab, Россия, или аналогичные).
4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный) или пакеты и емкости (Zip-Lock пакеты) для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов однократного применения.
5. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся

пробирки объемом 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

6. Иглы со стерильным шприцем или пастеровская пипетка с фильтром.
7. Автоматические дозаторы переменного объема.
8. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.
9. Металлические инструменты (скальпели, ножницы и т.п.).
10. Анатомический пинцет.
11. Стерильный одноразовый шприц для взятия, транспортирования и хранения аллантоисной жидкости.
12. Пакеты и емкости для отбора, транспортирования и хранения полуфабрикатов, продуктов питания, однократного применения (Zip-Lock пакеты).
13. ФТА-карты.
14. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

Предварительная подготовка исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5 или 15, или 50 мл.
3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и/или 5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

7. Стерильные фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.
8. Мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм.
9. Ватно-марлевые фильтры.
10. Стеклянная или полипропиленовая воронка.
11. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
12. Стерильный одноразовый шприц для взятия, транспортирования и хранения аллантаоисной жидкости.
13. Аналитические или прецизионные весы.
14. Физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер.
15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
17. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Автоматическая станция для экстракции НК (например, система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов человека Auto-Pure 96 («Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd.», Китай), РУ № РЗН 2021/14263, или процессор магнитных частиц KingFisher Flex 96 («Thermo Fisher Scientific», США), Р.У. № ФСЗ 2009/05562), зарегистрированная в РФ и удовлетворяющая следующим требованиям:⁴
 - возможность реализации последовательности этапов экстракции в соответствии с данной Инструкцией;
 - наличие магнитного штатива или магнитных стержней для сбора магнитного сорбента;
 - наличие термостата или термошейкера с возможностью нагрева не менее чем до 80 °С;
 - наличие системы перемешивания жидкостей

⁴ Только для автоматической экстракции.

шейкированием или пипетированием.

3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
7. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2,0 мл (например, «Promega», США).
8. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Ахуген», США).
12. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
14. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
15. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Обратная транскрипция, амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 6. Автоматические или механические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), ДТпрайм («ДНК Технология», Россия).
 8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для исследования рекомендуется брать следующий биологический материал:

- мазки из клоаки, со слизистой глотки и трахеи;
- тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек;
- аллантаисная жидкость эмбрионов птиц,
- мазки биологического материала на транспортных ФТА картах,
- мазки с поверхности мяса, субпродуктов.

ВНИМАНИЕ! Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах.

ВНИМАНИЕ! При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Мазки со слизистой ротоглотки

Взятие материала со слизистых респираторного тракта проводится с задней стенки ротоглотки с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой, при необходимости предварительно обработав места поражения от гноя марлевым тампоном.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки с поверхности мяса и субпродуктов

При взятии мазков с поверхности мяса и субпродуктов пользуются стерильными ватными зондами. Перед взятием смывов тампоны смачивают стерильным физиологическим

раствором. После взятия смыва тампон погружают в емкость с физиологическим раствором.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Мазки из клоаки

Взятие материала провести путем введения зонда в задний проход (клоаку) на глубину 4 – 5 см, аккуратно вращая зонд вокруг оси, собрать материал на зонд, осторожно извлечь зонд. Перенести зонд в пробирку с транспортной средой.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Аллантоисная жидкость

Для получения аллантоисной жидкости в скорлупе куриных эмбрионов прокалывают отверстие и отбирают стерильным шприцем в пробирку объемом 1,5 мл 1,0–1,5 мл аллантоисной жидкости.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Тканевой (аутопсийный) материал

Кусочки органов размером 1x1x1 см (головной мозг, трахея, лёгкие, воздухоносные мешки, сердце, селезенка, кишечник, почки) отбирают в стерильные контейнеры.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

FTA-карты

Исследуемые образцы наносят на поверхность FTA-карт согласно рекомендациям Производителя, указанным в инструкции по их применению.

Хранение и транспортировка FTA-карт осуществляется согласно рекомендациям Производителя, указанным в инструкции по их применению.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК

Мазки со слизистой ротоглотки

Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции РНК/ДНК отбирают 100 мкл образца.

Мазки с поверхности мяса и субпродуктов

Подготовка к экстракции НК осуществляется аналогично мазкам со слизистой ротоглотки.

Мазки из клоаки

Подготовка к экстракции НК осуществляется аналогично мазкам со слизистой ротоглотки.

Аллантоисная жидкость

Подготовка к экстракции НК осуществляется аналогично мазкам со слизистой ротоглотки.

Тканевой (аутопсийный) материал

Пробы тканей и органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию, используя стерильный физиологический раствор или фосфатный буфер. Суспензию переносят в пробирку

объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Для экстракции РНК/ДНК отбирают 100 мкл надосадочной жидкости.

FTA-карты

Подготовка к экстракции НК с FTA-карт осуществляется согласно рекомендациям Производителя, указанным в инструкции по их применению.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК из биологического материала птиц (мазки из клоаки, ротоглотки, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек, аллантаисная жидкость эмбрионов птиц, мазки биологического материала на транспортных FTA картах), а также из мазков с поверхности мяса и субпродуктов, используется комплект реагентов «РИБО-преп ВЕТ» вариант 100 или «Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100.

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

Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп ВЕТ» вариант 100

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку **10 мкл ВКО IC-R1**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО** внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО РНК InfA H5**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65°C** в термостате.
5. Снова центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки.
6. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
7. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин (11,5 тыс g)**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** без фильтра для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Центрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный

отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на **200 мкл** для каждой пробы.

12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный для каждой пробы наконечник без фильтра на **200 мкл**.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 90 мкл.
17. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин (11,5 тыс g)** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК/ДНК. Пробы готовы к последующему исследованию методом амплификации нуклеиновых кислот.

Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °C до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°C – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °C.

Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100, методика ручной экстракции с использованием магнитного штатива

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 60 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая

отрицательный и положительный контроли выделения). Промаркировать пробирки.

3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл **ВКО IC-R1, Буфер GT и Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО IC-R1, 10 мкл Буфера GT и 20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше.
4. Внести в пробирки по **40 мкл подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента**.
5. Добавить в пробирки **500 мкл Лизирующего буфера Комбо**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим буфером **100 мкл исследуемого образца** и тщательно перемешать на вортексе.
7. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО РНК InfA H5**.
8. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе.
9. Прогреть пробирки **5 мин при 60°C** в термостате.
10. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**.

Примечание. Необходимо открыть крышки до постановки в магнитный штатив, если в магнитном штативе их неудобно/невозможно открыть без взмучивания сорбента.

11. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно отобрать надосадочную жидкость по внутренней стенке, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки Комбо-1**, закрыть крышки.

Примечание. Необходимо поставить пробирки в обычный штатив, если в магнитном штативе неудобно/невозможно плотно закрыть крышки.

13. Ресуспендировать магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **1 мин**.
14. Открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость как описано выше.

15. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки Комбо-2**, перемешать на вортексе, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
16. Поместить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем открыть крышки, осторожно удалить надосадочную жидкость.
17. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **5-10 минут**.
18. Добавить в пробирки по **100 мкл Элюирующего буфера** и перемешать на вортексе.
19. Поместить пробирки в термостат при температуре **60 °С на 5 мин**, через 2 мин перемешать на вортексе.
20. Кратко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
21. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.
22. Не вынимая пробирки из магнитного штатива, перенести надосадочную жидкость в новые пробирки.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

Экстракция РНК из исследуемых образцов при использовании комплекта реагентов «Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100, методика автоматической экстракции

ВНИМАНИЕ! К работе с автоматической станцией может быть допущен только персонал, прошедший обучение. Программирование последовательности действий, указанной ниже, осуществляется с использованием инструкции к конкретному виду станции.

1. **Лизирующий буфер Комбо** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Смешать в отдельной пробирке **ВКО IC-R1, Буфер GT и Магнитный сорбент** из расчета на один образец **10 мкл ВКО IC-R1, 10 мкл Буфера GT и 20 мкл Магнитного сорбента**. При расчете необходимо учитывать запас –

- рассчитывать на одну точку больше.
3. Внести в пробирки или лунки глубоколоночного планшета (в зависимости от модели автоматической станции) для исследуемых и контрольных образцов по **40 мкл подготовленной смеси ВКО, буфера GT и магнитного сорбента.**
 4. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT и магнитного сорбента **500 мкл Лизирующего буфера Комбо.**
 5. Добавить в пробирки или лунки глубоколоночного планшета со смесью ВКО, буфера GT, магнитного сорбента и Лизирующего буфера Комбо по **100 мкл исследуемых образцов.**
 6. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) внести **100 мкл ОКО.** В пробирку положительного контроля выделения (ПК) внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО РНК InfA H5.**
 7. Для станций с магнитным штативом поместить на борт автоматической станции емкости с **Раствором для отмывки Комбо-1, Раствором для отмывки Комбо-2 и Элюирующим буфером.** Для станций с магнитными стержнями внести в лунки соответствующих глубоколоночных планшетов, размещаемых на автоматической станции, по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1, 500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2 и по 100 мкл Элюирующего буфера.**
 8. Установить пробирки или планшет с исследуемыми и контрольными образцами, полученными в соответствии с пунктами 5 и 6, на борт автоматической станции.
 9. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми и контрольными образцами **при 60°C в течении 5 мин.**
 10. Для станций с магнитным штативом поместить пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в магнитный штатив на **1 мин.** Для станций с магнитными стержнями опустить в лунки планшета с исследуемыми образцами магнитные стержни на **1 мин.**
 11. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из

магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **700 мкл Раствора для отмывки Комбо-1**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-1.

12. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.
13. Повторить пункт 10.
14. Для станций с магнитным штативом удалить надосадочную жидкость, не вынимая пробирки из магнитного штатива, добавить в каждую пробирку с исследуемыми образцами по **500 мкл Раствора для отмывки Комбо-2**. Для станций с магнитными стержнями перенести магнитные стержни с намагниченным сорбентом в лунки планшета с раствором для отмывки Комбо-2.
15. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами.
16. Повторить пункт 10.
17. Для станций с магнитным штативом высушить магнетизированную силику, оставив открытые пробирки на магнитном штативе в течение **5 минут**. Для станций с магнитными стержнями высушить магнетизированную силику оставив магнитные стержни с намагниченным сорбентом на открытом воздухе в течение **5 минут**.
18. Для станций с магнитным штативом добавить в пробирки по **100 мкл Элюирующего буфера**. Для станций с магнитными стержнями поместить магнитные стержни в лунки планшета с элюирующим буфером.
19. Перемешивать содержимое пробирок или лунок планшета с исследуемыми образцами при **60°C в течении 5 мин**.
20. Для станций с магнитным штативом перенести раствор в чистые пробирки, не вынимая пробирки с магнитным сорбентом из магнитного штатива. Для станций с магнитными стержнями удалить магнитный сорбент из лунок планшета с помощью магнитных стержней.
21. Полученная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Очищенная РНК/ДНК может храниться при

температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и при температуре не выше минус 68°С – год и более. Не рекомендуется хранить очищенную РНК более 30 мин при температуре плюс 2-8 °С.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ 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 РНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL InfA H5, 5 мкл ОТ-ПЦР-буфера-R, 0,5 мкл Taq полимеразы, 0,25 мкл Ревертазы (MMiv)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL InfA H5**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: **ПЦР-смеси-FL InfA H5, ОТ-ПЦР-буфера-R, Taq полимеразы, Ревертазы (MMiv)**, осадить капли на вортексе.
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ОТ-ПЦР РНК исследуемых и контрольных проб.
4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной

реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

6. Поставить контрольные реакции.
 - 1) **положительный контроль экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО РНК InfA H5**.
 - 2) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.
 - 3) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и РНК-пробы, и контролей.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 3).

Таблица 3 – Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного	Количество циклов
------	-----------------	-------	--------------------------	-------------------

⁵ Rotor-Gene Q (QIAGEN)

⁶ CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ДНК Технология, Россия)

			сигнала по каналам для флуорофоров	
1	50	10 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	15 с	-	45
	60	30 с	FAM, JOE	
	72	15 с	-	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки или стрипы (аналогичные используемым) по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных данных проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам в соответствии с таблицей 1 настоящей инструкции.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов (см. табл. 4).

Таблица 4 – Принципы интерпретации результатов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
определено или отсутствует	<u>определено меньше граничного</u>	Обнаружена РНК вируса гриппа А субтипа Н5
определено меньше граничного	отсутствует	Не обнаружена РНК вируса гриппа А субтипа Н5
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации кДНК в соответствии с таблицей 5 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 5 — Контроль достоверности этапов экстракции РНК, обратной транскрипции и амплификация с детекцией в режиме «реального времени»

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

OK	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
K-	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции РНК и ОТ-ПЦР (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM, JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов (начиная с этапа экстракции РНК).
2. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (K-) определено значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM, JOE. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK) определено значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора JOE. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (параметрах базовой линии), требуется повторно провести ПЦР-исследование для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование.

Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Набор реагентов при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «РИБО-преп ВЕТ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО РНК InfA H5, ВКО IC-R1 хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

ПЦР-смесь-FL InfA H5 хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 1 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Форма 2. Комплект реагентов «Магно-Сорб-Комбо ВЕТ» вариант 100 и прилагаемые к нему контрольные образцы этапа экстракции в составе ПКО РНК InfA H5, ВКО IC-R1 и ОКО хранить при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-96 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Реагент К- допустимо хранить при температуре от минус 24 до плюс 8 °С.

ПЦР-смесь-FL InfA H5 хранить в защищенном от света месте.

Набор реагентов формы 2 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Набор реагентов техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 119121, Российская Федерация, г. Москва, Погодинская ул., д.10 стр. 1, e-mail: promlab@cspfmba.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Руководитель
производственной лаборатории



Тарасова
Ж.Е.Тарасова

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Дата изменения		Использовать до
	Температурный диапазон		Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель		Не допускать воздействия солнечного света
	Беречь от влаги		Дата изготовления
	Знаки опасности		
			
			