

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

«_____» _____ 2007 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

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

Набор выпускается в двух вариантах комплектации: вариант FEP или вариант FRT.

Вариант FEP состоит из трех комплектов реагентов:

- «**РИБО-сорб**» вариант 50 - комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «**РЕВЕРТА-L**» вариант 50 - комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК;
- «**АмплиСенс**» вариант FEP- комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Для детекции используется флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «Джин» производства «ДНК-технология», Россия или «АЛА-1/4» производства «BioSan», Латвия).

Вариант FRT состоит из трех комплектов реагентов:

- «**РИБО-сорб**» вариант 50 - комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «**РЕВЕРТА-L**» вариант 50 - комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК;
- «**АмплиСенс**» вариант FRT- комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Для детекции используются амплификаторы с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, приборы Rotor-Gene 2000/3000/6000 фирмы «Corbett Research», Австралия, или «iQiCycler» фирмы «BioRad», США, или «SmartCycler» фирмы «Cepheid», США).

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора

Н.В.Медуницын

« 11 »

2007 г.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.И.Покровский
« _____ » 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и идентификации субтипа H5N1 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

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

Набор выпускается в двух вариантах комплектации: вариант FER или вариант FRT.

Вариант FER состоит из трех комплектов реагентов:

- «РИБО-сорб» вариант 50 - комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «РЕВЕРТА-L» вариант 50 - комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК;
- «АмплиСенс» вариант FER- комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Для детекции используется флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «Джин» производства «ДНК-технология», Россия или «АЛА-1/4» производства «BioSan», Латвия).

Вариант FRT состоит из трех комплектов реагентов:

- «РИБО-сорб» вариант 50 - комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «РЕВЕРТА-L» вариант 50 - комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК;
- «АмплиСенс» вариант FRT- комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК *Influenza virus A* и идентификации субтипа H5N1 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Для детекции используются амплификаторы с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, приборы Rotor-Gene 2000/3000/6000 фирмы «Corbett Research», Австралия, или «iQiCycler» фирмы «BioRad», США, или «SmartCycler» фирмы «Cepheid», США).

ФОРМА ВЫПУСКА.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	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-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Дополнительно:

ОКО (отрицательный контрольный образец)	Желтая опалесцирующая жидкость	1,6	3 пробирки
ВКО STI-гес (внутренний контрольный образец)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект рассчитан на выделение РНК из 50 проб, включая контрольные образцы (на каждые 10 клинических проб ставится по одному отрицательному контролю выделения).

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ДТТ лиофилизированный	Порошок белого цвета	-	5 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект рассчитан на 60 реакций обратной транскрипции, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «АмплиСенс» вариант FEP включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP <i>Influenza virus A</i> раскапана в пробирки под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок 0,5 мл или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Вязкая прозрачная бесцветная 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

Дополнительные реагенты для идентификации субтипа H5N1 *Influenza virus A*:

Реактив	Описание	Объём (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP <i>Influenza virus A</i> H5N1 <i>раскапана в пробирки под воск</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок 0,5 мл 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 рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «АмплиСенс» вариант FRT включает:

Для прибора «Rotor-Gene 2000/3000/6000», «iQiCycler»:

Реактив	Описание	Объём (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Influenza virus A</i> <i>раскапана в пробирки под воск</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-F1	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

Дополнительные реагенты для идентификации субтипа H5N1 *Influenza virus A*:

Реактив	Описание	Объём (мл)	Кол-во
*ПЦР-смесь-1-FRT <i>Influenza virus A</i> H5N1 <i>раскапана в пробирки под воск</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок 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

Для прибора «SmartCycler» фирмы «Cepheid», США:

Реактив	Описание	Объём (мл)	Кол-во
*ПЦР-смесь-1-FRT <i>Influenza virus A</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	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
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Дополнительные реагенты для идентификации субтипа H5N1 *Influenza virus A*:

Реактив	Описание	Объём (мл)	Кол-во
*ПЦР-смесь-1-FRT <i>Influenza virus A</i> H5N1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	5 пробирок
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

* Для прибора «SmartCycler II» («Cepheid», США) используются фирменные пробирки. Комплект рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контрольные образцы.

НАЗНАЧЕНИЕ.

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

Набор рассчитан на 50 тестов, включая контрольные образцы.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Перед началом работы следует ознакомиться с «Методическими рекомендациями по забору, транспортировке, хранению клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва, 2007).

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с 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 пипеточными 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.

Для исследования используют следующий материал.

Материал от людей:

- мазки и/или смывы из полости носа и ротоглотки, аспират из трахеи, фекалии, секционный материал.

Взятие мазков из полости носа.

Мазки (слизь) 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 стерильного физиологического раствора или раствора фосфатного буфера. Состав фосфатного буфера: натрия хлорид 137 мМ,

калия хлорид 2,7 мМ, натрия монофосфат 10 мМ, калия дифосфат 2 мМ; рН $7,5 \pm 0,2$. Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают крышкой.

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 стерильного физиологического раствора или раствора фосфатного буфера. Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

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.

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 экстракции РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

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.

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 или 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 суток 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 при комнатной температуре.

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 экстракции РНК.

Материал от животных:

- фекалии, мазки из клоаки, трахеальные смывы, внутренние органы.

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

Фекалии (в стерильных контейнерах).

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

Мазки из клоаки.

Берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. После забора материала

7
293
тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора или раствора фосфатного буфера. 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, используют без предварительной подготовки.

Внутренние органы (фрагменты трахеи и легких, селезенка, мозг) в одноразовых стерильных контейнерах.

Внутренние органы животных и секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс. об./мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость используют для экстракции РНК.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

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

Анализ проводится в три этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно «Методическим рекомендациям по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции», утвержденным в 1995 г. ГК СЭН.

2. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.

3. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом.

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

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для этапа выделения РНК из исследуемого материала требуются:

1. Стерильный ламинарный шкаф (БОВ-001-АМС, г.Миасс, Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО-24», фирмы «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16000 g (например, фирмы «Elmi», Латвия, фирмы «Hettish», Германия).
4. Центрифуга/вортекс (например «Micro-Spin», Германия, «ТЭТА-2», фирмы «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, ОМ-1, г.Ульяновск, Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, фирмы «Ленпипет», Россия).
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл (например, фирмы «Ахуген», США).
9. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, фирмы «Хеликон», Россия) и накопечников (например, фирмы «Ленпипет», Россия).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, фирмы «Ленпипет», Россия).
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл, свободные от РНКаз, и до 1000 мкл (например, фирмы «Ахуген», США).
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения обратной транскрипции и этапа амплификации, а также детекции продуктов амплификации требуются:

1. Амплификатор (например, «Rotor-Gene 2000/3000 или 6000» фирмы «Corbett Research» (Австралия), или «iQiCycler» фирмы «BioRad», США, или «SmartCycler» фирмы «Cepheid», США) (только для комплекта «АмплиСенс» вариант FRT).
2. Амплификатор (например, «Терцик», фирмы «ДНК-технология», Россия или «GeneAmp PCR System 2700» фирмы «Applied Biosystems», США) (только для комплекта «АмплиСенс» вариант FEP).
3. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «Джин», «ДНК-Технология» или «АЛА-1/4», «BioSan», Латвия) (только для комплекта «АмплиСенс» вариант FEP).
4. ПЦР-бокс (например, «Циклотемп», фирмы СП «РТС», Россия).

5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», фирмы «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, фирмы «Ленпипет», Россия).
7. Штативы для микропробирок объемом 0,5 и 0,2 мл (например, фирмы «Хеликон», Россия).
8. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл (например, фирмы «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для микропипеток в штативах (например, фирмы «Хеликон», Россия).
10. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 и 200 мкл (например, фирмы «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С; морозильник на минус 18±2 °С для хранения выделенной ДНК.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.

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

А. Выделение РНК из подготовленного материала.

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. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку **450 мкл лизирующего раствора, 10 мкл ВКО и 50 мкл ОКО**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором, ВКО и ОКО** внести по **50 мкл исследуемого образца**, используя отдельные наконечники с аэрозольным барьером, перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре 3-5 мин.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **50 мкл ОКО**.
5. Плотны закрытые пробы перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки. 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, процентрифугировать 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. Процентрифугировать 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, процентрифугировать 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 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
13. В пробирки с высушенным сорбентом добавить по **40 мкл РНК-элюента**, используя наконечник с аэрозольным барьером (имеющий специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free»). Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °C на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать 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 и ПЦР.

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 максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C. Для длительного хранения препарата, необходимо, не захватывая сорбент, отобрать раствор РНК, перенести в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 68 °C в течение года.

ЭТАП 2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР.

Проводится в ЗОНЕ 2 - комнате для подготовки и проведения амплификации (ПЦР).

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.

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

Порядок работы:

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

1. Подготовить необходимое количество микропробирок на 0,5 (0,2) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с лиофилизированным **DTT** добавить 125 мкл **RT-mix** и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить 6 мкл **ревертазы**, пипетировать 5 раз, осторожно 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 аэрозольным барьером добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

Полученный 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 1 года.

Постановка ПЦР с использованием комплекта «АмплиСенс» вариант FEP (с детекцией результатов ПЦР путем измерения флуоресцентного сигнала по «конечной точке»)

См. Приложения 1, 2.

Постановка ПЦР с использованием набора «АмплиСенс» вариант FRT (с детекцией результатов ПЦР путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»)

См. Приложения 3, 4, 5.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов необходимо проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) в контейнеры, содержащие 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03; при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 сут. При получении разуккомплектовать.

Хранение. В соответствии с СП 3.3.3.1248-03; комплекты «РИБО-сорб» (кроме РНК-элюента) и «АмплиСенс» – при температуре от 2 до 8 °С. Комплект «РЕВЕРТА-L» и РНК-элюент (из комплекта «РИБО-сорб») – 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 ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), а также на предприятие-изготовитель: ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-54-24, факс (495) 305-54-23), e-mail: obtk@pcr.ru.)

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора



В.И. Покровский

Руководитель Государственных испытаний
Зав.лабораторией биохимии и биотехнологии
ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

Р.А.Волкова