

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от 16.07.2010 № 6723-Пр/10

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  
«17» февраля 2010 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2)  
вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной  
цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-  
флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Influenza virus A*-тип-FL»**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ .....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК .....	11
ВАРИАНТ FEP .....	13
СОСТАВ .....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....	13
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК .....	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ .....	14
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	15
Б. Проведение амплификации .....	16
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» .....	17
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	17
ВАРИАНТ FRT .....	21
СОСТАВ .....	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....	22
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК .....	23
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	23
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	23
А1. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT .....	24
А2. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F .....	25
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	27
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ .....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Экстракция РНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» .....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Экстракция РНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» .....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Экстракция РНК из проб при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG .....	36
Вариант 1. Экстракция РНК с лизисом образца вне прибора .....	36
Вариант 2. Экстракция РНК с лизисом образца в приборе .....	37
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ .....	39

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
кДНК	- Комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ПКО	- Положительный контрольный образец
ВКО STI-rec	- Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ОК	- Отрицательный контроль экстракции (выделения) РНК/ДНК
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
ВК+	- Положительный контроль амплификации образца ВКО
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup> *Influenza virus A-тип-FL*» предназначен для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в культурах вирусов гриппа и в клиническом материале, содержащем РНК вирусов гриппа А.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы кДНК, полученные из образцов следующего клинического материала: мазков из полости носа и ротоглотки, мокроты (либо аспириатов из трахеи), секционного материала, в которых была обнаружена РНК *Influenza virus A*.

Для экстракции РНК/ДНК и получения кДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Набор реагентов рекомендуется использовать для анализа образцов кДНК, в которых была обнаружена РНК *Influenza virus A* в процессе исследования клинического материала или культур вирусов с набором реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup> *Influenza virus A/B-FL*».

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Полный анализ включает в себя три этапа: экстракцию

Вариант FEP Форма 1: [REF](#) V54-50-R0,5-FEP, [REF](#) H-1021-2-5; Форма 2: [REF](#) V54-50-R0,2-FEP, [REF](#) H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: [REF](#) R-V54, [REF](#) H-1021-1-2; Форма 2: [REF](#) R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), [REF](#) H-1022-1 / [VER](#) 11.02.10 / стр. 3 из 39

РНК/ДНК из образцов клинического материала, получение образца кДНК в реакции обратной транскрипции РНК, ПЦР-амплификацию участков генов гемагглютинаина и нейраминидазы вирусов гриппа в присутствии флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов и детекцию флуоресцентного сигнала, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция нуклеиновых кислот вирусов гриппа из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-rec), использование которого позволяет контролировать качество выполнения процедур исследования для каждого образца.

## **ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**Набор реагентов выпускается в 2 вариантах.**

### **Вариант FEP**

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

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

Формы комплектации предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и различаются пробирками разной вместимости, предназначенными для разного типа амплификаторов. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК и получения кДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

### **Вариант FRT**

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл).

**Форма 2** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Формы комплектации предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл)

выпускается в пробирках для амплификации. Форма комплектации «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F не содержит пробирок для амплификации.

Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК и получения кДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

Комплект для выделения РНК/ДНК	Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
«РИБО-преп»	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FRT	1x10 <sup>3</sup> копий/мл
	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FEP	1x10 <sup>3</sup> копий/мл
«РИБО-сорб»	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FRT	1x10 <sup>3</sup> копий/мл
	Мазки из полости носа и ротоглотки	«Транспортная среда для респираторных мазков»	«ПЦР-комплект» Вариант FEP	1x10 <sup>3</sup> копий/мл

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты генов гемагглютинаина и нейраминидазы эпидемических штаммов вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2.

Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании эталонных штаммов и 26 изолятов эпидемических вирусов гриппа А/Н1N1, 23 изолятов эпидемических вирусов гриппа А/Н3N2 выделенных с 1977 по 2008 гг. в РФ, Республиках Украина и Беларусь, а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении фрагментов генов гемагглютинаина и

нейраминидазы вирусов гриппа А субтипов H13, H9, H8N4, H2N3, H2N9, N8, H4N6, H11N6, H12N5, H6, H10N7, H5N3, H7, H5, H5N3, вирусов гриппа В линий Ямагата и Виктория, а также кДНК/ДНК штаммов и изолятов основных возбудителей ОРЗ человека, нормальной микрофлоры полости носа и ротоглотки человека и кДНК/ДНК человека.

При исследовании изолятов вируса гриппа варианта A/H1N1(sw2009) (A/California/04/2009(H1N1)) в реакции с ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Influenza virus A H1N1* наблюдается положительная реакция по идентификации гемагглютинина тип1 и отрицательная реакция по идентификации нейраминидазы тип1, что означает «эпидемический вирус гриппа субтипа H1N1 не идентифицирован (не обнаружен)».

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах), организованных в соответствии с нормативной базой.
- Следует рассматривать образцы как потенциально вызывающие инфекцию и проводить манипуляции с ними в биологическом кабинете в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Работу следует проводить в средствах индивидуальной защиты рекомендованных в нормативных документах.
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или

Вариант FEP Форма 1: [REF](#) V54-50-R0,5-FEP, [REF](#) H-1021-2-5; Форма 2: [REF](#) V54-50-R0,2-FEP,

[REF](#) H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: [REF](#) R-V54, [REF](#) H-1021-1-2; Форма 2:

[REF](#) R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), [REF](#) H-1022-1 / [VER](#) 11.02.10 / стр. 6 из 39

реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».
- Перед анализом полностью разморозить необходимое количество хранившихся в замороженном состоянии реагентов при комнатной температуре. После размораживания перемешать содержимое пробирок на вортексе и центрифугировать для удаления капель с внутренней поверхности крышек.
- На всех этапах кроме этапа отбора супернатанта после центрифугирования при проведении экстракции нуклеиновых кислот использовать наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов. Для каждого образца использовать новый наконечник.
- В целях предотвращения контаминации образцов на этапе экстракции нуклеиновых кислот перед открыванием пробирок следует проводить кратковременное центрифугирование для удаления капель жидкости с внутренней поверхности крышек пробирок.

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **СБОР МАТЕРИАЛА ДЛЯ АНАЛИЗА**

1. Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, ТУ 9398-083-01897593-2009) – реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки.

### **ПРОВЕДЕНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ МАТЕРИАЛА**

1. Муколизин (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) – реагент для проведения предварительной подготовки мокроты и аспиратов вязкой консистенции.

### **ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ. (ЗОНА 1)**

1. Комплект реагентов для выделения – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
3. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК (например «NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>™</sup>» («bioMérieux», Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
4. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например «NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>™</sup>» (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) («bioMérieux», Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

### **ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ. (ЗОНА 2)**

1. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» с реагентом RT-G-mix-1 (ТУ 9398-005-01897593-2008).

### **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР И ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-**

Вариант FEP Форма 1: **REF** V54-50-R0,5-FEP, **REF** H-1021-2-5; Форма 2: **REF** V54-50-R0,2-FEP, **REF** H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2; Форма 2: **REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 11.02.10 / стр. 8 из 39



## АМПЛИФИКАЦИИ. (ЗОНА 2)

**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), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems», США), «MaxyGene» («Ахуген», США) или эквивалентные. Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «ALA-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), или эквивалентный.

**Вариант FRT:** амплификатор роторного типа, например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) или амплификатор SmartCycler II (Cepheid, США) или эквивалентные.

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл и от 50 до 1000 мкл).
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл в штативах.
6. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
7. Холодильник от 2 до 8°С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для проб кДНК.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость для сброса наконечников.
10. 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 прибора для ПЦР в реальном времени «SmartCycler II» («Cepheid», США). Одноразовые полипропиленовые микропробирки на 0,025 мл («Cepheid», США).

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

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

Для проведения анализа используется следующий клинический материал:

- мазки из полости носа и ротоглотки;
- мокрота (либо аспираты из носоглотки и трахеи);
- секционный материал (фрагменты пораженной части легких).

### Сбор мазков из полости носа

Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Если полость носа заполнена слизью перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. 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. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

### Сбор 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. Конец зонда отламывают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

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

#### Мокрота или аспират из носоглотки или трахеи

Мокроту собирают в стерильные одноразовые контейнеры, после предварительного полоскания полости рта водой. Аспираты из носоглотки и трахеи получают традиционным способом и помещают в стерильные одноразовые контейнеры.

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.

Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия либо исследуют в течение 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

### **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ РНК/ДНК**

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами и др. материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

**Мазки из респираторного тракта.** 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.

**Мокрота или аспират из трахеи.** Работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для выделения РНК/ДНК. При

Вариант FEP Форма 1: **REF** V54-50-R0,5-FEP, **REF** H-1021-2-5; Форма 2: **REF** V54-50-R0,2-FEP,

**REF** H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2; Форма 2:

**REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 11.02.10 / стр. 11 из 39

необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

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

## ВАРИАНТ FEP

### ВАРИАНТ FEP СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A* субтипов H1N1 и H3N2 с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> H1N1 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок емкостью 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A</i> H3N2 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок емкостью 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H1N1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A</i> H3N2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI	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.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

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

### ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов
- Получение образца кДНК в реакции обратной транскрипции РНК
- Проведение амплификации
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по

Вариант FEP Форма 1: [REF] V54-50-R0,5-FEP, [REF] H-1021-2-5; Форма 2: [REF] V54-50-R0,2-FEP, [REF] H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: [REF] R-V54, [REF] H-1021-1-2; Форма 2: [REF] R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), [REF] H-1022-1 / [VER] 11.02.10 / стр. 13 из 39

«конечной точке».

– Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-FL».

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК**

Для экстракции РНК/ДНК и проведения реакции обратной транскрипции используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция РНК/ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-rec**). Процедура использования рекомендованных наборов реагентов детально описана в **Приложении**.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ**

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

**ВНИМАНИЕ!** На этапе амплификации для каждого наименования ПЦР-смеси-1-FEP/FRT используются 2 пробирки «Фон», положительные контроли амплификации, положительный контроль амплификации внутреннего контрольного образца, и отрицательный контроль амплификации, предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора при каждой постановке эксперимента. Кроме того на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции РНК/ДНК (ОК).

### Соответствие наименования ПЦР-смесь-1-FEP/FRT и положительных контрольных образцов амплификации

Наименование ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Название положительных контрольных образцов
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ПКО кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ПКО кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>

#### А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT** соответствующего наименования (см. табл. 1) для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
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**.
3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить по 2 образца **«Фон»** для каждого наименования **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT**. Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT** на поверхность застывшего воска внести **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР**.
5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
6. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT**, см. табл. 1):
  - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** - внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.

- б) **положительный контроль ПЦР (К+)** - внести в пробирку **10 мкл ПКО (см. табл. 1)**.
- в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** - внести в пробирку **10 мкл ПКО STI**.
- г) **отрицательный контроль экстракции (выделения) (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из образца **ОК**.

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

**Б. Проведение амплификации**

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

Таблица 2

**Программа амплификации кДНК *Influenza virus A H1N1* и *A H3N2***

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

**Примечание** – Программы термоциклирования для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа A (*Influenza virus A*) методом



полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-FL».

3. По окончании выполнения программы приступить к детекции результатов.

### **ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»**

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по каналам указанным в табл. 3.

Таблица 3

#### **Соответствие наименования ПЦР-смесь-1-FEP/FRT и каналов детекции**

Наименование ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Детекция по каналу		
	FAM	HEX	ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H1</i>	<i>Influenza virus A N1</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H3</i>	<i>Influenza virus A N2</i>

**ВНИМАНИЕ!** До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к набору реагентов и методические рекомендации ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-FL».

### **ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб кДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Принцип интерпретации результатов следующий:

Вариант FEP Форма 1: **REF** V54-50-R0,5-FEP, **REF** H-1021-2-5; Форма 2: **REF** V54-50-R0,2-FEP, **REF** H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2; Форма 2: **REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 11.02.10 / стр. 17 из 39

- Искомый фрагмент гена-мишени **обнаружен**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу (см. табл. 3) выше установленного порогового значения положительного результата.
- Искомый фрагмент гена-мишени **не обнаружен**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу (см. табл. 3) ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу FAM(ВКО) выше установленного порогового значения.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК, в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

**Результаты анализа контрольных образцов**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM	HEX	ROX
		Детекция ВКО	Детекция гена-мишени (H1/H3)	Детекция гена-мишени (N1/N2)
OK	Экстракция РНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
BK+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
K+	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Пороги для каждого образца ПКО указаны во вкладыше</u>	<u>Пороги для каждого образца ПКО указаны во вкладыше</u>

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа А субтип H1 (или A/H3), если уровень флуоресценции по каналу HEX выше порогового значения.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа

Вариант FEP Форма 1: **REF** V54-50-R0,5-FEP, **REF** H-1021-2-5; Форма 2: **REF** V54-50-R0,2-FEP,

**REF** H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2; Форма 2:

**REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 11.02.10 / стр. 18 из 39

A/N1 (или A/N2), если уровень флуоресценции по каналу ROX выше порогового значения.

Если в исследуемом образце уровень флуоресценции по обоим или одному из каналов (HEX и ROX) ниже порогового значения отрицательного результата, а уровень сигнала по ВКО выше порогового значения для детекции ВКО (канал FAM), следует считать, что в этом образце данный субтип A/N1N1 (или A/N3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал флуоресценции по соответствующему каналу ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал детекции гена-мишени выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен данный ген-мишень, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу для детекции данного гена-мишени (см. табл. 3) ниже установленного порогового значения отрицательного результата и сигнал по каналу детекции ВКО (FAM) ниже установленного порогового значения. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу для детекции данного гена-мишени (см. табл. 3) выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями).

Если для пробы получен **невалидный** или **сомнительный** результат, требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК. При повторении **невалидного** результата рекомендовать повторный сбор материала для анализа. При

## **ВАРИАНТ FEP**

---

повторении **сомнительного** результата пробу считать положительной, при получении отрицательного результата при повторной постановке **сомнительной** пробы рекомендовать повторный сбор материала для анализа.

## ВАРИАНТ FRT

### ВАРИАНТ FRT СОСТАВ

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT –** комплект реагентов для амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A* субтипов H1N1 и H3N2 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-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок вместимостью 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок вместимостью 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирки
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

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

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F –** комплект реагентов для ПЦР-амплификации и идентификации кДНК *Influenza virus A* субтипов H1N1 и H3N2 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

## ВАРИАНТ FRT

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H1N1</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	10 пробирок
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) <i>Influenza virus A H3N2</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	10 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	10 пробирок

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов.
- Получение образца кДНК в реакции обратной транскрипции РНК.
- Проведение ПЦР-амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридной-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A-тип-FL*».

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК**

Для экстракции РНК/ДНК и проведения реакции обратной транскрипции используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Экстракция РНК/ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-rec**). Процедура использования рекомендованных наборов реагентов детально описана в **Приложении**.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

**ВНИМАНИЕ!** На этапе амплификации при каждой постановке реакции используются положительные контроли амплификации (см. табл. 5), положительный контроль амплификации внутреннего контрольного образца, и отрицательный контроль амплификации, предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора. Кроме того на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции РНК/ДНК (ОК).

Таблица 5

### **Соответствие наименования ПЦР-смесь-1-FEP/FRT и положительных контрольных образцов амплификации**

<b>Наименование ПЦР-смесь-1-FEP/FRT</b>	<b>Название положительных контрольных образцов</b>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ПКО кДНК <i>Influenza virus A H1N1</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ПКО кДНК <i>Influenza virus A H3N2</i>

### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

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

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

**А1. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT** соответствующего наименования (см. таблицу 5) для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
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**.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб кДНК**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT**, см. таблицу 5):
  - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
  - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО** (см. табл. 5).
  - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI**.
  - г) **отрицательный контроль экстракции (выделения) (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из **ОКО**.
5. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, кратким центрифугированием на вортексе (1–2 с) (для приборов планшетного типа).
6. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 6).



**Программа амплификации кДНК *Influenza virus A H1N1* и *A H3N2* вариант FRT**

Цикл	Приборы роторного типа <sup>1</sup>		
	Температура, °C	Время	Число повторов циклов
1	<b>95</b>	5 мин	1
2	<b>95</b>	10 с	10
	<b>54</b>	20 с	
	<b>72</b>	10 с	
3	<b>95</b>	10 с	35
	<b>54</b>	20 с детекция флуо-ресц. сигнала	
	<b>72</b>	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

7. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

**ВНИМАНИЕ!** Не рекомендуется одновременная постановка реакций по идентификации субтипов H1N1 и H3N2.

8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

**A2. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F**

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT (F)** соответствующего наименования (см. таблицу 5), **ПЦР-смесью-2-FRT** и полимеразой (**TaqF**). Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT (F)**, **ПЦР-смесью-2-FRT** и полимеразой (**TaqF**) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.

2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.

3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке

<sup>1</sup> например, «Rotor-Gene 3000» «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» или аналогичные

Вариант FEP Форма 1: **REF** V54-50-R0,5-FEP, **REF** H-1021-2-5; Форма 2: **REF** V54-50-R0,2-FEP,

**REF** H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2; Форма 2:

**REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 11.02.10 / стр. 25 из 39

- 10\*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FEP/FRT (F)** соответствующего наименования (см. таблицу 5), **5\*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT** и **0,5\*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**.
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
  5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
  6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК**.
  7. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F)**, см. таблицу 5):
    - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
    - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО** (см. таблицу 5).
    - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI**.
    - г) **отрицательный контроль экстракции (выделения) (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.
  8. При работе с прибором Smart Cycler II осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, используя миницентрифугу к прибору.
  9. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

Таблица 7

**Программа амплификации кДНК *Influenza virus A H1N1* и *A H3N2*  
Вариант FRT-100 F**

Цикл	Приборы роторного типа <sup>2</sup>			Приборы типа Smart Cycler II <sup>3</sup>		
	Температура	Время	Число повторов циклов	Температура	Время	Циклы
1	95 °C	15 мин	1	95 °C	900 с	1
2	95 °C	10 с	10	95 °C	15 с	42
	54 °C	20 с				
	72 °C	10 с				
3	95 °C	10 с	35	54 °C	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	54 °C	20 с детекция флуоресц. сигнала				
	72 °C	10 с				
				72 °C	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

**Примечание** – Программа термоциклирования для конкретной модели амплификатора описана в методических рекомендациях «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-FL».

10. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

**ВНИМАНИЕ!** Не рекомендуется одновременная постановка реакций по идентификации субтипов H1N1 и H3N2.

11. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

## **АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с

<sup>2</sup> например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные

<sup>3</sup> например, Smart Cycler II или аналогичные

детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов в соответствии с **табл. 8** с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов.

Таблица 8

**Перечень каналов детекции обнаруживаемых генов-мишеней**

Наименование ПЦР-смесь-1- FEP/FRT	Детекция по каналу		
	FAM/Green	JOE/Yellow/ Cy3	ROX/Orange/ TexasRed
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H1N1</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H1</i>	<i>Influenza virus A N1</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Influenza virus A H3N2</i>	ВКО и ПКО STI	<i>Influenza virus A H3</i>	<i>Influenza virus A N2</i>

Принцип интерпретации результатов следующий:

- Искомый фрагмент гена-мишени **обнаружен**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу (**см. табл. 8**) определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- Искомый фрагмент гена-мишени **не обнаружен**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу (**см. табл. 8**) не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК/ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (**табл. 9**).

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM/Green	JOE/Yellow/Cy3	Rox/Orange/Texas Red
		Детекция ВКО	Детекция Гена-мишени (H1/H3)	Детекция Гена-мишени (N1/N2)
OK	Экстракция РНК	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
K-	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
BK+	ПЦР	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
K+	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Пороги для каждого образца ПКО указаны во вкладыше</u>	<u>Пороги для каждого образца ПКО указаны во вкладыше</u>

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/H3), если имеется значение *Ct* по каналу JOE/Yellow/Cy3.

В исследуемом образце идентифицирован вирус гриппа A/N1 (или A/N2), если имеется значение *Ct* по каналу ROX/Orange/Texas Red.

Если в исследуемом образце отсутствуют значения *Ct* по обоим или одному из каналов (JOE/Yellow/Cy3 и ROX/Orange/Texas Red), а значение *Ct* по ВКО не превышает порогового значения для детекции ВКО (канал FAM/Green), следует считать, что в этом образце данный субтип A/H1N1 (или A/H3N2) эпидемического вируса гриппа не идентифицирован (не обнаружен).

Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла по соответствующему каналу детекции какого-либо гена-мишени отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных по данному каналу клинических образцов.

Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналу детекции

## ВАРИАНТ FRT

---

какого-либо гена-мишени определено значение порогового цикла  $C_t$ , необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен данный ген-мишень, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла  $C_t$  по одному из каналов детекции генов-мишеней (см. табл. 8), и по каналу для ВКО (FAM) значение  $C_t$  также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции РНК/ДНК. При повторении результата рекомендовать повторный сбор материала для анализа.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения  $C_t$  указаны во вкладыше к набору реагентов и в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для типирования (идентификации) субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Influenza virus A*-тип-FL».

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** Вариант FEP (Форма 1, Форма 2) и вариант FRT Форма 1 – 9 мес. Вариант FRT Форма 2 – 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

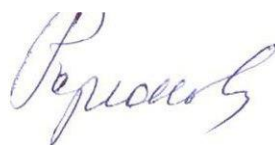
**Хранение.** Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-2-FRT, реагенты ПЦР-смесь-1-FEP/FRT (F) (объемом 0,12 мл), полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

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

Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя по адресу в сети интернет: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

Заведующий НПЛ  
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

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



Г.М.Игнатьев

### ПРИЛОЖЕНИЕ А. Экстракция РНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»

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** и по **10 мкл ВКО STI-rec**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО STI-rec** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. Перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре от 3 до 5 мин.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**.
5. Плотно 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. 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



## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

---

- 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 п. 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 с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
  13. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с аэрозольным барьером, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °С 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.

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.

### ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Экстракция РНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

#### Порядок работы:

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 по **10 мкл ВКО STI-rec** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-rec** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. 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.
9. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**,

Вариант FEP Форма 1: **REF** V54-50-R0,5-FEP, **REF** H-1021-2-5; Форма 2: **REF** V54-50-R0,2-FEP,

**REF** H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V54, **REF** H-1021-1-2; Форма 2:

**REF** R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), **REF** H-1022-1 / **VER** 11.02.10 / стр. 34 из 39

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

---

плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Центрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °С** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Центрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

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.

### ПРИЛОЖЕНИЕ В. Экстракция РНК из проб при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG

#### Вариант 1. Экстракция РНК с лизисом образца вне прибора

Данный метод выделения позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

#### Порядок работы:

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению РНК/ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения РНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **25** mkl, тип образца (*Type*) – Lysed, очередность выделения РНК в образцах (*priority*) – normal.
3. Создать новый протокол выделения РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: *On-board Lysis Buffer Dispensing-no, On-board Lysis Incubation-no*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10** мкл **ВКО STI-rec**. Добавить в пробирки по **550** мкл **буфера для лизиса NucliSens**.

**ВНИМАНИЕ!** При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объемом 1,5 мл. После окончания инкубации (см. п. 8) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО STI-rec**, внести

Вариант FEP Форма 1: [REF](#) V54-50-R0,5-FEP, [REF](#) H-1021-2-5; Форма 2: [REF](#) V54-50-R0,2-FEP, [REF](#) H-1022-2-2; Вариант FRT Форма 1: [REF](#) R-V54, [REF](#) H-1021-1-2; Форма 2: [REF](#) R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC), [REF](#) H-1022-1 / [VER](#) 11.02.10 / стр. 36 из 39

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

- по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**.
  8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
  9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
  10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
  11. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР**.

При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после выделения. **Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.**

### Вариант 2. Экстракция РНК с лизисом образца в приборе.

#### Порядок работы:

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения РНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **25 mkl**, тип образца (*Type*) – Primary, очередность выделения РНК в образцах (*priority*)- normal.
3. Создать новый протокол выделения РНК/ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

---

происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes.*

4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-rec.**
6. В пробирки с **ВКО** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) внести **100 мкл ОКО.**
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения РНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении *Instrument State – Idle.*
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу выделения РНК.
12. После окончания выделения РНК, извлечь пробирки из прибора и **не позднее 30 мин после окончания процедуры выделения РНК провести реакцию ОТ-ПЦР.**

При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после выделения. **Очищенные РНК можно хранить до 8 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.**

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации.

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

**ВНИМАНИЕ!** При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые 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 аэрозольным 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.**