

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ФГБУ  
«Всероссийский государственный  
Центр качества и стандартизации  
лекарственных средств для животных  
и кормов»

И.Л. Обухов

« 14 » *апрель* 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ

Президент  
АНО «НИИ ДПБ»

О.А. Верховский

« 14 » *апрель* 2015 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для обнаружения и дифференциации  
вируса гриппа А подтипа H5N1 методом полимеразной цепной реакции в реальном  
времени (организация-разработчик – АНО «НИИ ДПБ», г. Москва)

### 1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

**1.1 Тест-система для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.**

**1.2 Тест-система состоит из 2 наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы**

| №  | Наименование                    | Количество | Упаковка   |
|--|---------------------------------|------------|------------|
| Набор I – для выделения РНК  |                                 |            |            |
| 1  | Раствор-1                       | 18,0 мл    | 2 флакона  |
| 2  | Раствор-2                       | 12,0 мл    | 1 флакон   |
| 3  | Раствор-3                       | 12,0 мл    | 1 флакон   |
| 4  | Сорбент                         | 2,0 мл     | 1 пробирка |
| 5  | Деионизованная вода             | 2,0 мл     | 1 пробирка |
| Набор II - для выявления РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени |                                 |            |            |
| 1  | Тaq-полимераза                  | 0,015 мл   | 1 пробирка |
| 2  | MMLV-ревертаза +ингибитор РНКаз | 0,038 мл   | 1 пробирка |
| 3  | Положительный контроль H5N1     | 0,2 мл     | 5 пробирок |
| 4  | ПЦР-смесь H5N1                  | 0,4 мл     | 1 пробирка |
| 5  | Буфер для ПЦР                   | 0,9 мл     | 1 пробирка |

Тест-система предназначена для выявления РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 в крови, сыворотке крови, носовых и трахеальных смывах, органах птиц и свиней, помете птиц, яйцах и эмбрионах птиц, комбикормах.

#### 1.2 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл и 20 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Наборы I и II отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и разработчика и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения.

Набор I упакован в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены типографским способом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение СТО, надпись «Для ветеринарного применения». В каждую упаковку вложена инструкция по применению тест-системы.

#### 1.3 Условия хранения и транспортирования.

Набор I хранить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 25<sup>0</sup>С, Набор II – при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С.

Транспортирование Набора I упакованного в картонную или пластиковую коробку проводить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 25<sup>0</sup>С. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка).

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления.

Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и неиспользованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов необходимо проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т.

## II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

**2.1** Анализ по обнаружению и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени включает выделение суммарной РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфических фрагментов методом ПЦР в реальном времени. Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют ДНК-зонды (короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, синтезированные химическим путем), комплементарные внутренним участкам фрагментов гемагглютинина H5 и нейраминидазы N1 вируса гриппа А подтипа H5N1. В тест-системе используются 2 зонда с различными красителями: HEX-BHQ1 для детекции гена гемагглютинина и FAM-BHQ1 для детекции гена нейраминидазы. В ходе ПЦР происходит разъединение флуоресцентных меток и гасителей, что приводит к появлению свечения, по интенсивности которого исследователь может узнать о ходе реакции в каждый момент времени.

Основным преимуществом ПЦР в реальном времени по сравнению с классической ПЦР является отсутствие стадии электрофореза, что позволяет снизить риск контаминации продуктами ПЦР и сократить время проведения анализа.

## III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

При выполнении исследований следует соблюдать условия и требования МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

### 3.1 Подготовка к работе

#### 3.1.1 Необходимые условия для успешного проведения анализа:

- Строго соблюдать условия хранения и транспортирования компонентов тест-системы (см. п. 1.3).
- Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки применять нельзя.
- На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.
- Для отбора образцов биоматериала использовать одноразовую посуду или посуду, тщательно обработанную хромовой смесью, отмытую и стерилизованную.
- Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять кратковременным центрифугированием, избегая случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.
- Готовить реакционные смеси и работать с прибором для проведения ПЦР в реальном времени следует в одноразовых перчатках.
- На всех стадиях обработки биоматериала удаление надосадочной жидкости производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% раствор хлорамина или 5% раствор перекиси водорода и т. п.).

#### 3.1.2 Необходимые материалы и оборудование

- Ламинарный бокс (класс биологической безопасности II);
- ПЦР-бокс;
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25<sup>0</sup>С до 100<sup>0</sup>С;
- Настольная центрифуга типа «Эппендорф»;
- Встряхиватель типа «Vortex»;
- Отсасыватель медицинский вакуумный с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- Холодильник бытовой от 2<sup>0</sup>С до 8<sup>0</sup>С с морозильной камерой;
- Амплификатор типа ДТ-96 («ДНК-технология», Россия), «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research» Австралия) или аналогичные;
- Набор пипеточных дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для пипеточных дозаторов с аэрозольным барьером (фильтром) до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
- Микропробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф»;
- Микропробирки объемом 0,2 мл;
- Штативы для микропробирок объемом 1,5 и 0,2 мл;
- Отдельный халат и одноразовые перчатки из латекса;
- Средства для обеззараживания и дезинфекции рабочего места.

### 3.1.2 Подготовка и хранение исследуемого материала:

**КРОВЬ:** цельную кровь в объеме 2 мл отобрать в одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом (3-6% раствор ЭДТА, 3,8% раствор цитрата натрия и т.п.). **Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта!** Пробирки с цельной кровью смешанной с антикоагулянтом хранить и транспортировать при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для исследования использовать 200 мкл цельной крови без предварительной подготовки, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**СЫВОРОТКА КРОВИ:** сыворотку крови отобрать в одноразовые пластиковые пробирки, хранить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С не более 3 суток, при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С не более 30 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для исследования использовать 200 мкл сыворотки крови без предварительной подготовки, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**ОРГАНЫ ПТИЦ (фрагменты легких и трахеи, кишечник, мозг, селезенка) И СВИНЕЙ (фрагменты легких и трахеи):** пробы органов отобрать стерильными инструментами в одноразовые пластиковые флаконы. Пробы хранить и транспортировать при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С не более 24 ч, при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С не более 2 недель. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Приготовить 10% суспензию в физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе. Для этого кусочки органов весом 1-2 г измельчить ножницами и гомогенизировать в стерильном физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, используя стерильные фарфоровые ступки и пестики. Для выделения РНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**ПОМЕТ ПТИЦ:** отобрать стерильными инструментами пробу помета. Приготовить 10% суспензию в физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, тщательно ресуспендировать, дать отстояться в течение 10 мин. Надосадок перенести в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл и центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Для выделения РНК использовать 200 мкл надосадочной жидкости, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**НОСОВЫЕ И ТРАХЕАЛЬНЫЕ СМЫВЫ:** пробы хранить и транспортировать при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С не более суток, при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С не более 2 недель. Для выделения РНК использовать 200 мкл смывов, помещенных в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**ЯЙЦА ПТИЦ:** до исследования хранить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С не более 5 суток. Для отбора пробы в скорлупе яйца проколоть отверстие стерильной иглой с шприцем и

отобрать яичный белок. Для выделения РНК использовать 200 мкл яичного белка, помещенного в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**ЭМБРИОНЫ ПТИЦ (инкубационные яйца):** до исследования хранить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С не более 5 суток. Для отбора пробы в скорлупе проколоть отверстие стерильной иглой со шприцем и отобрать аллантоисную жидкость. Для выделения РНК использовать 200 мкл аллантоисной жидкости, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**КОМБИКОРМА:** пробу комбикорма тщательно гомогенизировать. Приготовить 10% суспензию в физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, тщательно ресуспендировать, дать отстояться в течение 10 мин. Надосадок перенести в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Для выделения РНК использовать 200 мкл надосадочной жидкости, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

**КОНТРОЛИ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения РНК (п. 3.2). Рекомендуется использовать по одному положительному и одному отрицательному контролю на каждые 8 исследуемых проб. В качестве положительного контроля H5N1 используется рекомбинантная плазида, содержащая ген гемагглютинина H5 и ген нейраминидазы N1. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля H5N1. Пробирку с положительным контролем размораживать непосредственно перед выделением. Повторной заморозке положительный контроль не подлежит. Выделенный положительный контроль (5 мкл) использовать для постановки ПЦР (п. 3.3). Для длительного хранения выделенного положительного контроля необходимо аккуратно, не захватывая сорбент, отобрать надосадок, перенести его в стерильную пробирку и хранить при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С не более 7 суток, не допуская многократного размораживания.

В качестве отрицательного контроля выделения использовать 200 мкл деионизированной воды.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С, размораживать непосредственно перед использованием.

### 3.2 Выделение РНК

Для выделения РНК из исследуемого биологического материала следует использовать Набор I - для выделения РНК.

- Отобрать и промаркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительный и отрицательный контроли выделения.
- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60<sup>0</sup>С до 65<sup>0</sup>С до полного растворения.
- Внести в каждую подготовленную пробирку по 600 мкл раствора-1.
- В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 200 мкл образцов биологического материала и контролей в следующей последовательности:
  1. В пробирку маркированную «К-» внести 200 мкл деионизированной воды;
  2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
  3. В пробирку, маркированную «К+» внести 200 мкл положительного контроля H5N1.

Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером (фильтром).

- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2)<sup>0</sup>С, каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.
- Отобрать и промаркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительный и отрицательный контроли выделения. Пробирку с сорбентом встряхнуть на смесителе типа “Vortex”, до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.
- Инкубированные пробы центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 1 минуту при максимальном количестве оборотов. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале

перенести отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительный контроль. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

- Перемешать пробы на смесителе типа "Vortex" до полного ресуспендирования сорбента.
- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре  $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа "Vortex" до полного ресуспендирования сорбента.
- Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальном количестве оборотов. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
- К осадку добавить 100 мкл раствора-2, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать пробы на смесителе типа "Vortex" до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальном количестве оборотов. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

Процедуру повторить еще раз.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-3, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа "Vortex" до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальном количестве оборотов. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

Процедуру повторить еще раз.

- Осадок подсушить в течение 10 минут при  $56^{\circ}\text{C}$ , крышки у пробирок должны быть открыты.

- Добавить к осадку 30 мкл деионизованной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа "Vortex" до полного ресуспендирования осадка.

- Инкубировать пробы 10 минут при  $56^{\circ}\text{C}$  в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на смесителе типа "Vortex". Центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Надосадочная жидкость содержит выделенную РНК и предназначена для проведения ПЦР. Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных проб. Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше  $6^{\circ}\text{C}$  не более 15 минут.

- При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные маркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительный контроль. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные РНК-пробы заморозить при температуре от минус  $18^{\circ}\text{C}$  до минус  $20^{\circ}\text{C}$  и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР, не допускается многократное размораживание проб.

### 3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовать Набор II – для выявления РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени.

#### 3.3.1 Подготовка пробирок и приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР в реальном времени

Отобрать и промаркировать необходимое количество пробирок с оптически прозрачной крышкой объемом 0,2 мл с учетом положительных («К+») и отрицательных («К-») контролей.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на  $n+1$  образцов, где  $n$  – количество проб с учетом положительных и отрицательных контролей. Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 1. Все реактивы **кроме Taq-полимеразы и MMLV-ревертазы+ингибитора РНКаз** должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда. **Taq-полимеразу и MMLV-ревертазу+ингибитор РНКаз** добавляют в последнюю очередь, при составлении смеси их следует держать во льду.

Перед открыванием пробирок с Taq-полимеразой и MMLV-ревертазой+ингибитором РНКаз рекомендуется осадить капли со стенок и крышки кратким центрифугированием.

таблица 1

| Реактив                        | Кол-во на 1 пробу (мкл) | Кол-во на n проб (мкл) |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Буфер для ПЦР                  | 15,25                   | 15,25 x (n+1)          |
| ПЦР-смесь H5N1                 | 6,5                     | 6,50 x (n+1)           |
| Taq-полимераза                 | 0,25                    | 0,25 x (n+1)           |
| MMLV-ревертаза+ингибитор РНКаз | 0,625                   | 0,625 x (n+1)          |

Реакционную смесь перемешать, избегая образования пены. Осадить капли с крышки и стенок пробирки кратковременным центрифугированием. Немедленно внести по 20 мкл реакционной смеси в промаркированные пробирки. В подготовленные пробирки с реакционной смесью сначала внести выделенный отрицательный контроль (5 мкл). Затем в соответствующие пробирки внести по 5 мкл РНК исследуемых образцов. В последнюю очередь внести 5 мкл выделенного положительного контроля H5N1. Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Поместить пробирки в прибор для проведения ПЦР в реальном времени.

### 3.3.2 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

- Запустить программу **RealTime\_PCR**;
- В диалоговом окне выбора режима работы программы выбрать существующего оператора или добавить нового оператора. Затем выбрать режим **Работа с прибором**;
- В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый для работы прибор и нажать кнопку **Подключить**. После этого на экране появится окно работы с прибором. Необходимо дождаться, пока кнопка **Прибор включен** станет зеленого цвета;
- В меню **Тест** в верхней части рабочего окна **RealTime\_PCR** выбрать команду **Создать/редактировать тест**;
- Выбрать **Создать новый тест**, ввести название нового теста и нажать **ОК**. На экране появится окно **Тест**;
- В поле **Описание** рекомендуется указать назначение и особенности теста; в пункте **Анализ** в окошке **Тип** выбрать **Качественный**, в окошке **Метод** выбрать **Пороговый (Ct)**; в пункте **Пробирки** отметить образцы, которые будут использоваться при проведении исследования: **Образец**, **Контроль +**, **Контроль -**; в пункте **Контроли** указать количество используемых положительных и отрицательных контрольных образцов; в пункте **Объем рабочей смеси в пробирке** выставить **25 мкл**;
- В пункте **Флуорофоры** для каналов **Fam** и **Nex** выбрать пункт **Специфика**, для остальных каналов – пункт **Отсутствует**;
- В пункте **Программа амплификации** выбрать кнопку **Создать новую программу**; в окне **Шаблон программ амплификации** выбрать наиболее подходящий по структуре шаблон. Нажать кнопку **Применить**. При необходимости использовать кнопки **Добавить строку**, **Удалить строку**, **Добавить блок**, **Удалить блок**;
- В поле **Имя программы** написать название программы; при необходимости заполнить поле **Описание**;
- Отредактировать программу амплификации для выявления РНК вируса гриппа А подтипа H5N1. Для этого выставить температурно-временные параметры согласно таблице 2:

Таблица 2

| № блока | Температура, С <sup>0</sup> | мин | сек | Число циклов | Детекция |
|---------|-----------------------------|-----|-----|--------------|----------|
| 1       | 50,0                        | 30  | 0   | 1            |          |
|         | 94,0                        | 5   | 0   |              |          |
| 2       | 94,0                        | 0   | 10  | 40           |          |

|  |      |   |    |  |   |
|--|------|---|----|--|---|
|  | 55,0 | 0 | 15 |  | ✓ |
|  | 72,0 | 0 | 10 |  |   |

- Нажать кнопку **ОК**;
- В появившемся окне в поле **Имя файла** ввести имя созданной программы, используя буквы латинского алфавита; в поле **Папка** выбрать папку на диске для сохранения программы и нажать кнопку **Сохранить**;
- В появившемся окне **Тест** нажать кнопку **ОК**;
- На экране появится рабочее окно **RealTime\_PCR** и вкладка **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в открывшемся окне выбрать название своего теста из списка;
- Указать количество исследуемых образцов и количество повторов (дублей) каждого образца в разделе **Образцы**. При необходимости можно изменить количество положительных и отрицательных контролей. Нажать кнопку **ОК**. Данные вносятся в протокол автоматически. При необходимости можно их отредактировать непосредственно в окне протокола. Расположение пробирок в блоке амплификатора также заполняется автоматически, при необходимости можно расположить их в произвольном порядке.
- Для перехода к запуску программы амплификации нажать кнопку **Применить**;
- На экране появится вкладка **Запуск программы амплификации**. При необходимости можно заполнить поле **Комментарий**;
- Проверить программу амплификации, при необходимости ее можно отредактировать, нажав кнопку **Редактировать**. На экране появится окно **Редактор программ амплификации** с таблицей данных используемой программы;
- После внесенных изменений нажать кнопку **ОК**. На экране появится окно запуска программы амплификации.
- Подготовить пробирки согласно п.3.3.1;
- В окне запуска программы амплификации нажать кнопку **Открыть блок**. Поставить подготовленные пробирки в гнезда амплификатора строго в соответствии с расположением, указанным в протоколе. Нажать кнопку **Закреть блок**;
- Нажать кнопку **Запуск программы**.
- Назвать эксперимент и сохранить его на диске.
- После завершения работы программы нажать кнопку **ОК**, чтобы перейти к анализу оптических измерений.

### 3.3.3 Проведение ПЦР в реальном времени с помощью прибора «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

- Поместить подготовленные в п.3.3.1. пробирки в карусель амплификатора Rotor-Gene. Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 или «Rotor-Gene» 6000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6 или 1.7 (build 67) соответственно, или выше. Провести программирование амплификатора:
- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы;
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**;
- Нажать кнопку **Next/Далее**;
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл**;
- Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 ml oil layer volume/15.L объем масла/воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**. Задать следующие параметры эксперимента:

1. Hold/Удерж.темп-ры 50<sup>0</sup>С – 30 мин;
2. Hold/Удерж.темп-ры 94<sup>0</sup>С – 5 мин;
3. Cycling/Циклирование 94<sup>0</sup>С – 10с,  
55<sup>0</sup>С – 15с,  
72<sup>0</sup>С – 10с

- Cycle repeats/Цикл повторить 5 times/раз.
4. Cycling/Циклирование 94<sup>0</sup>С – 10с,  
55<sup>0</sup>С – 15с – Детекция флюоресценции  
72<sup>0</sup>С – 10с

Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.

Флюоресценцию измерять при 55<sup>0</sup>С на каналах FAM/Green, JOE/Yellow. Нажать дважды кнопку ОК/Да.

• В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мыш,** выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.** Для обоих каналов (FAM/Green, JOE/Yellow) установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5F1** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10F1.** Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Закреть.**

• Нажать кнопку **Next/Далее,** запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт.**

• Дать название эксперимента и сохранить его на диске. В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец.**

#### IV АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

##### 4.1 Анализ результатов амплификации генов гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа А подтипа H5N1 на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

После завершения работы программы нажать кнопку **ОК** и перейти к анализу результатов оптических измерений:

1. В поле **Тип анализа** указать **St(Cp)** для всех каналов, в поле **Метод – Пороговый (Ct)**;
2. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа.** В открывшейся вкладке установить: Критерий положительного результата ПЦР – 90%, Критерии достоверности результата: нижняя граница/порог положительного результата – 10%, верхняя граница/порог нормализации данных – 30%. Нажать кнопку **Применить.**
3. Для обоих каналов (Fam и Hex) установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) так, чтобы она пересекала кривую флуоресценции на участке характерного экспоненциального подъема, переходящего в линейный подъем.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 3.

Таблица 3

| Название образца | Сигнал по каналу             |                              | Комментарии к результатам ПЦР в реальном времени  |
|------------------|------------------------------|------------------------------|---|
|                  | Fam                          | Hex                          |   |
| К-               | отсутствует или $Ct \geq 35$ | отсутствует или $Ct \geq 35$ | В отрицательном контроле отсутствует вирус гриппа А подтипа H5N1.   |
| Образец 1        | присутствует, $Ct \leq 34$   | отсутствует или $Ct \geq 35$ | В образце присутствует вирус гриппа А/N1. Вирус гриппа А подтипа H5N1 отсутствует. Образец считать отрицательным. |
| Образец 2        | отсутствует или $Ct \geq 35$ | присутствует, $Ct \leq 34$   | В образце присутствует вирус гриппа А/H5. Вирус гриппа А подтипа H5N1 отсутствует. Образец считать отрицательным. |
| Образец 3        | присутствует, $Ct \leq 34$   | присутствует, $Ct \leq 34$   | В образце присутствует вирус гриппа А подтипа H5N1. Образец считать положительным.                                |
| К+               | присутствует,                | присутствует,                | В положительном контроле  |



|  |              |              |   |
|--|--------------|--------------|---|
|  | $Ct \leq 34$ | $Ct \leq 34$ | присутствует вирус гриппа А подтипа H5N1. |
|--|--------------|--------------|---|

Образец следует считать положительным, если для обоих каналов (Fam и Hex) определено значение порогового цикла и оно не превышает 35. Это свидетельствует о наличии в исследуемом образце вируса гриппа А подтипа H5N1.

Если значение порогового цикла определено только по каналу Hex и оно не превышает 35, это свидетельствует о наличии в исследуемом образце вируса гриппа А/H5. В исследуемом образце отсутствует вирус гриппа А подтипа H5N1. Образец следует считать отрицательным.

Если значение порогового цикла определено только по каналу Fam и оно не превышает 35, это свидетельствует о наличии в исследуемом образце вируса гриппа А/N1. В исследуемом образце отсутствует вирус гриппа А подтипа H5N1. Образец следует считать отрицательным.

Если в таблице результатов по обоим каналам (Fam, Hex) значения порогового цикла превышают 35 или отсутствуют, это свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце вируса гриппа А подтипа H5N1. Образец следует считать отрицательным.

#### 4.2 Анализ результатов амплификации генов гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа А подтипа H5N1 на приборе «Rotor-Gene» 3000/6000

1. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**;

2. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек.уклона**;

3. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**;

4. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

5. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.01**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

6. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**;

7. Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**. В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек.уклона**;

8. В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**;

9. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).

10. В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.01**. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Интерпретацию результатов ПЦР в реальном времени проводить согласно таблице 4.

Таблица 4

| Название образца | Сигнал по каналу             |                              | Комментарии к результатам ПЦР в реальном времени                  |
|------------------|------------------------------|------------------------------|---|
|                  | FAM/Green                    | JOE/Yellow                   |   |
| К-               | отсутствует или $Ct \geq 35$ | отсутствует или $Ct \geq 35$ | В отрицательном контроле отсутствует вирус гриппа А подтипа H5N1. |
| Образец 1        | присутствует,                | отсутствует                  | В образце присутствует вирус                                      |

|           |                                 |                               |   |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|---|
|           | $Ct \leq 34$                    | или $Ct \geq 35$              | гриппа А/Н1. Вирус гриппа А подтипа Н5Н1 отсутствует. Образец считать отрицательным.                              |
| Образец 2 | отсутствует<br>или $Ct \geq 35$ | присутствует,<br>$Ct \leq 34$ | В образце присутствует вирус гриппа А/Н5. Вирус гриппа А подтипа Н5Н1 отсутствует. Образец считать отрицательным. |
| Образец 3 | присутствует,<br>$Ct \leq 34$   | присутствует,<br>$Ct \leq 34$ | В образце присутствует вирус гриппа А подтипа Н5Н1. Образец считать положительным.                                |
| К+        | присутствует,<br>$Ct \leq 34$   | присутствует,<br>$Ct \leq 34$ | В положительном контроле присутствует вирус гриппа А подтипа Н5Н1.  |

Образец следует считать положительным, если для обоих каналов (FAM/Green и JOE/Yellow) определено значение порогового цикла и оно не превышает 35. Это свидетельствует о наличии в исследуемом образце вируса гриппа А подтипа Н5Н1.

Если значение порогового цикла определено только по каналу JOE-Yellow и оно не превышает 35, это свидетельствует о наличии в исследуемом образце вируса гриппа А/Н5. В исследуемом образце отсутствует вирус гриппа А подтипа Н5Н1. Образец следует считать отрицательным.

Если значение порогового цикла определено только по каналу FAM-Green и оно не превышает 35, это свидетельствует о наличии в исследуемом образце вируса гриппа А/Н1. В исследуемом образце отсутствует вирус гриппа А подтипа Н5Н1. Образец следует считать отрицательным.

Если в таблице результатов по обоим каналам FAM-Green и JOE-Yellow значения порогового цикла превышают 35 или отсутствуют, это свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце вируса гриппа А подтипа Н5Н1. Образец следует считать отрицательным.

## У МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

**5.1** Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При случайном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

**5.2** Запрещается прием пищи, воды, курение во время работы с компонентами тест-системы.

**5.3** Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана АНО «НИИ ДПБ». Адрес: 109518, г. Москва, Грайвороновский 1-ый проезд, д. 2а. Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.

Рекомендовано к применению ФГБУ «ВГНКИ»