



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

« 10 » апреля 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом полимеразной цепной реакции
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

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

1.2 Тест-система состоит из 3 наборов и рассчитана на проведение 100 анализов из 50 образцов, включая контроли (таблица 1).

Таблица 1

№	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 и дифференциации РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР			
1	Тақ-полимераза	0,030 мл	1 пробирка
2	MMLV-ревертаза+ингибитор РНКаз	0,038 мл	2 пробирки
3	Положительный контроль H5	0,2 мл	5 пробирок
4	Положительный контроль N1	0,2 мл	5 пробирок
5	Праймеры для ПЦР H5	0,27 мл	1 пробирка
6	Праймеры для ПЦР N1	0,27 мл	1 пробирка
7	Буфер для ПЦР	0,9 мл	2 пробирки
8	Минеральное масло	5,0 мл	1 флакон
Набор III - для проведения электрофореза (на 10 гелей по 10 образцов)			
1	Агароза	5 г	2 пакета
2	Концентрат буфера для электрофореза	20,0 мл	2 флакона
3	Бромистый этидий	0,3 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 в инфицированных клеточных культурах, комбикормах, материале от животных и птиц (кровь, сыворотка крови, лимфоузлы, фрагменты селезенки, трахеи, легких, носоглоточные смывы, помет птиц, яйца и эмбрионы птиц).

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-систем расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 20 мл и 13 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

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

Наборы I и III, упакованные в полиэтиленовые пакеты, вложены в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены несмываемой крас-

кой следующие обозначения: страна, город, наименование организации-производителя и/или товарный знак, полное наименование тест-системы, номер серии и контроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), предупредительная надпись «Для ветеринарного применения», количество анализов и обозначение СТО. В каждую коробку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4 Условия хранения и транспортирования

Наборы I и III необходимо хранить при температуре от 2°C до 25°C, Набор II – при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

Транспортирование Набора I и III проводить при температуре от 2°C до 25°C. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления. Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

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

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

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

2.1 В основе ПЦР лежит многократное повторение циклов денатурации исследуемой ДНК, гибридизации ДНК со специфическими праймерами и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы. В результате амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в миллионы раз, что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.2 Анализ по выявлению и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 включает: выделение суммарной РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфических фрагментов в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с двумя парами специфических праймеров и электрофорез в агарозном геле.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа

Строго соблюдать условия хранения и транспортирования компонентов тест-системы (см. п. 1.4).

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромовой смесью, отмыта, стерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять кратким центрифугированием.

При открывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

Бромистый этидий разлагается на свету и при нагревании, содержащие его растворы необходимо хранить в темном месте. При длительном хранении или многократном нагревании в растворы, содержащие бромистый этидий, перед употреблением следует внести свежую порцию бромистого этидия (5 мкл на 100 мл буфера).

3.1.2 Подготовка исследуемого материала

• **КРОВЬ:** пробы цельной крови должны быть обязательно консервированы 3-6%-ным раствором ЭДТА или 3,8%-ным раствором цитрата натрия. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью, смешанной с антикоагулянтом, хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **СЫВОРОТКА КРОВИ:** пробы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 5 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 30 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения РНК использовать 200 мкл сыворотки крови, помещенных в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **НОСОГЛОТОЧНЫЕ СМЫВЫ:** ватный тампон (зонд) после отбора материала поместить в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера, пробирку с тампоном плотно закрыть. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **ОРГАНЫ:** для исследования использовать кусочки трахеи, легких, лимфоузлов, селезенки, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Образец органа измельчить стерильными ножницами или растереть в физиологическом растворе или в фосфатном буфере (приготовить примерно 10% суспензию). Для выделения РНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 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.

• **ЯЙЦА ПТИЦ:** до исследования хранить при температуре от 2°C до 6°C не более 5 суток. Для отбора пробы в скорлупе яйца проколоть отверстие стерильной иглой со 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°C до 6°C 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.

• **КОМБИКОРМ:** 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 на каждые 7 исследуемых проб использовать один положительный контроль Н5, один положительный контроль N1 и один отрицательный контроль. Положительные контроли (генноинженерные препараты, содержащие фрагменты генов гемагглютинаина Н5 и нейраминидазы N1) размораживать непосредственно перед выделением. Повторной заморозке положительные контроли не подлежат. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля Н5 и 200 мкл положительного контроля N1. Выделенные контроли использовать для постановки ПЦР (п. 3.3). В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизованной воды.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18°С до минус 20°С, размораживать непосредственно перед использованием.

3.2 Выделение РНК

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

Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительные («К+Н5», «К+N1») и отрицательный («К-») контроли выделения.

• В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, инкубировать их при температуре от 60°С до 65°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 деионизованной воды;

2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

3. В пробирку, маркированную «К+Н5», внести 200 мкл положительного контроля Н5;

4. В пробирку, маркированную «К+N1», внести 200 мкл положительного контроля N1.

• Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

• Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.

• Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2°С), каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.

• Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая «К+Н5», «К+N1» и «К-». 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 на максимальном количестве оборотов. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+Н5» и «К+N1». 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±2)°С, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

• Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек на 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 на микроцентрифуге в течение 15 сек на 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 на микроцентрифуге в течение 15 сек на максимальном количестве оборотов. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.

- Осадок сушить в течение 10 минут при 56°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°C в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на смесителе типа “Vortex”. Центрифугировать в течение 1 мин на максимальном количестве оборотов. Надосадочная жидкость содержит выделенную РНК и предназначена для проведения ПЦР (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6°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 «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+H5» и «К+N1». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР (п. 3.3), не допускается многократное размораживание проб.

3.3. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР использовать **Набор II - для выявления и дифференциации РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР.**

Для определения подтипа H5N1 вируса гриппа А необходимо каждый образец проанализировать со специфическими праймерами H5 и N1. Для каждого образца параллельно нужно приготовить две реакционные смеси – одну с праймерами для ПЦР H5, другую с праймерами для ПЦР N1.

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с учетом положительных и отрицательных контролей. Параллельно в отдельных пробирках приготовить две реакционные смеси на n+1 образцов, где n – количество образцов с учетом положительных и отрицательных контролей. Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 2 и таблице 3. Все реактивы **кроме Taq-полимеразы и MMLV-ревертазы+ингибитор РНКаз** должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышек кратким центрифугированием (5-10 сек). Taq-полимеразу и MMLV-ревертазу + ингибитор РНКаз добавлять в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать их во льду, нагревание не допускается.

Таблица 2. Смесь для выявления подтипа H5

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР H5	4,5	4,5 x (n+1)
Taq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)
MMLV ревертаза + ингибитор РНКаз	0,625	0,625 x (n+1)

Таблица 3. Смесь для выявления подтипа N1

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР N1	4,5	4,5 x (n+1)
Taq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)
MMLV-ревертаза + ингибитор РНКаз	0,625	0,625 x (n+1)

Каждую смесь перемешать избегая образования пены и немедленно внести по 20 мкл в предварительно маркированные пробирки. В каждую пробирку добавить по 2-3 капли минерального масла (примерно 40 мкл).

В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести под слой масла по 5 мкл выделенных проб в следующей последовательности:

1. В пробирку маркированную «К-» внести 5 мкл отрицательного контроля;
2. В соответствующие пробирки внести по 5 мкл исследуемых проб;
3. В пробирку маркированную «К+Н5» внести 5 мкл положительного контроля Н5 (смесь с праймерами для ПЦР Н5);
4. В пробирку маркированную «К+Н1» внести 5 мкл положительного контроля Н1 (смесь с праймерами для ПЦР Н1).

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Запустить на амплификаторе программу:

50°C - 30 мин	}	1 цикл
95°C - 3 мин		
95°C - 20 сек	}	40 циклов
57°C - 20 сек		
72°C - 20сек		
72°C - 5 мин		1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 50°C (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Пробы, полученные после проведения ПЦР, можно хранить в течение 24 часов при комнатной температуре, в течение 72 часов при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

IV УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Результаты исследования учитываются путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в агарозном геле (**Набор III - для проведения электрофореза**).

4.1 Приготовление 1 л рабочего буфера для электрофореза: к 980 мл дистиллированной воды добавить 20 мл концентрата буфера для электрофореза и 40 мкл раствора бромистого этидия.

Буфер можно приготовить самостоятельно по следующей прописи: навеску 4,04 г Триса растворить в 200 мл дистиллированной воды, добавить 1,14 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА рН 8,0 и довести объём буфера до 1000 мл дистиллированной водой. После растворения компонентов буфера добавить 40 мкл раствора бромистого этидия.

4.2 Приготовление агарозного геля

В колбу из термостойкого стекла насыпать 2 г агарозы и добавить 100 мл рабочего буфера для электрофореза (п.4.1), перемешать вращением колбы и поместить в микроволновую печь или на водяную баню, нагревать до полного расплавления агарозы. Расплавленную агарозу охладить до 45-55°C, осторожно вращая колбу. Охлажденную агарозу залить в специальную форму, установить гребенки, не касаясь дна формы. Расстояние между гребёнками должно быть не менее 4 см, толщина геля около 0,5 см. После полного застывания геля гребёнки аккуратно вынуть, подложку с готовым гелем перенести в аппарат для горизонтального электрофореза (например, ПГ-9 «Диа - М», Россия), залить рабочим буфером для электрофореза, что бы он полностью покрывал всю поверхность геля. Гель должен располагаться лунками ближе к отрицательному электроду.

4.3 Электрофорез продуктов амплификации

Выставить в штатив пробирки с полученными пробами после проведения ПЦР (п. 3.3). Из каждой пробирки, из-под слоя масла, аккуратно отобрать 10 мкл амплификационной смеси и последовательно внести в лунки геля. Амплификационная смесь уже содержит краситель. Дополнительное смешивание амплификационной смеси с красителем не требуется. Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должен присутствовать соответствующий положительный контроль.

Электрофорез проводить при напряжении 8-10 В/см длины геля. **Краситель должен пройти не менее половины длины геля. Направление движения образцов в геле от “-” к “+”!**

4.4 Учет результатов электрофореза

Результаты электрофореза следует просматривать в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты реакции выявляются в виде светящихся красноватых полос.

Положительными считают образцы, в которых выявлены фрагменты, соответствующие фрагментам и H5 и N1 положительных контролей. Исследуемые пробы считают отрицательными, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагментам в контрольных положительных пробах (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта) или выявлены полосы, соответствующие фрагментам только H5 или только N1 (см. таблицу 4).

Таблица 4

Название образца	Подтип H5, размер фрагмента	Подтип N1, размер фрагмента	Комментарий к результатам ПЦР
Отрицательный контроль	-	-	В отрицательном контроле отсутствует вирус гриппа А подтипа H5N1.
Образец 1	-	-	В образце отсутствует вирус гриппа А подтипа H5N1. Результат отрицательный.
Образец 2	184 п.н.	-	В образце присутствует вирус гриппа А подтип H5. Подтип N1 отсутствует. Результат отрицательный.
Образец 3	-	213 п.н.	В образце присутствует вирус гриппа А подтип N1. Подтип H5 отсутствует. Результат отрицательный.
Образец 4	184 п.н.	213 п.н.	В образце присутствует вирус гриппа А подтип H5N1. Результат положительный.
Положительный контроль H5	184 п.н.	-	В положительном контроле присутствует фрагмент гена гемагглютинина H5 вируса гриппа А.
Положительный контроль N1	-	213 п.н.	В положительном контроле присутствует фрагмент гена нейраминидазы N1 вируса гриппа А.

В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос. Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительных контролей свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты аннулируются. Анализ необходимо провести заново, начиная с этапа выделения РНК, приняв меры для ликвидации контаминации.

V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Бромистый этидий является мутагеном, проникающим через кожу. При работе с ним использовать резиновые или латексные перчатки.

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги кожи и слизистой оболочки глаз. При просмотре гелей пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5.3 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. Работать необходимо в перчатках. При

случайном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.