

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
РНК ВИРУСА ГРИППА А СУБТИПОВ H5N1, H7N7 и H7N9
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
Ветскрин. ПГА-генотип**

2018



БИОМАТЕРИАЛ

Биоматериал	Взятие образца для анализа	Хранение/транспортировка
Мазки из полости носа, ротоглотки, глотки, трахеи и клоаки	Для взятия материала используют одноразовые зонды. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку, содержащего 500 мкл стерильного физиологического раствора, вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.	неохлажденные образцы использовать в течение 2-х часов для выделения РНК. Допускается хранение биопроб при -18...-20°C - не более 2-х недель. Допускается только однократное размораживание материала.
Соскобы со слизистых, эпидермиса, отпечатки с конъюнктивы	Для взятия материала используют одноразовые зонды, имеющие ватный тампон с повышенной адсорбцией, «щёточки». Материал собирают поскребывающими движениями и переносят в пробирку, содержащую 0,5мл физиологического раствора, тщательно смывают весь материал, тампон отжимают о стенку пробирки и удаляют зонд. Соскобы с эпидермиса берут стерильным скальпелем.	
Смывы с конъюнктивы, из полости носа, из ротоглотки	Для приготовления смывов используют стерильные зонды с ватными тампонами и стерильные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 500 мкл стерильного физиологического раствора.	
Плазма или сыворотка крови	500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия. ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!) – для получения плазмы, либо в пустую пробирку – для получения сыворотки. При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (с ЭДТА, для получения плазмы) или красной крышкой (для получения сыворотки).	неохлажденные образцы использовать в течение 2-х часов для выделения РНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; не замораживать!

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА БИОМАТЕРИАЛА

- **Образцы мазков, смывов и инфицированных клеточных культур** не требуют предварительной подготовки
- **Образцы органов и тканей, мясо, субпродукты и полуфабрикаты, соскобы, помет:**
готовят **10% суспензию** на стерильном физиологическом растворе (для приготовления суспензии поместить объем образца соответствующий 100 мкл в микроцентрифужную пробирку, затем довести объем пробы до 1 мл стерильным физ.раствором), тщательно гомогенизируют и центрифугируют при **1 000 об/мин в течение 1 минуты**. Для выделения РНК использовать надосадочную жидкость.
- **Яйца птиц:**
При исследовании яиц в скорлупе прокалывается отверстие, иглой со стерильным шприцом или пастеровской пипеткой отбирают в отдельную пробирку объемом 1,5 мл 0,5-1 мл яичного белка.
- **Эмбрионы кур:**
При исследовании куриных эмбрионов в скорлупе прокалывается отверстие, иглой со стерильным шприцом или пастеровской пипеткой отбирают в отдельную пробирку объемом 1,5 мл 0,5-1 мл аллантаической жидкости.

ПРОЦЕДУРА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК

За 20-30 минут до начала работы растворы **для выделения РНК 1 и 2** (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия. Прогреть раствор 1 при 60°C до полного растворения кристаллов.

- 1.1. В промаркированные пробирки на 1,5 мл внести по **450 мкл 1-ого раствора** для выделения РНК.
 - Внести в пробирки согласно маркировке исследуемые образцы по 50 мкл, образцы плазмы и сыворотки крови вносятся по 100 мкл.
 - В пробирку отрицательного контроля внести 100 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО).
- 1.2. Пробирки закрыть и тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 10 сек.
- 1.3. Осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе.
- 1.4. Пробирки инкубировать при **60°C в течение 5 мин.**
Отцентрифугировать пробирки при 13 тыс. об/мин в течение 1 мин и перенести надосадочную часть в новую пробирку.
- 1.5. Внести в каждую пробирку по **13 мкл ЭВК-РНК**, пробирки закрыть и тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 10 сек.
- 1.6. Осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе и инкубировать **при 60°C в течение 5 мин.**
- 1.7. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл ресуспендированного сорбента**. Содержимое пробирок перемешать и оставить на **5 мин при комнатной температуре**.
- 1.8. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки. Внести в каждую пробирку по **200 мкл Раствора 4** и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

Количество пробирок	5	10	15	20
Разбавитель, мкл (17,5 мкл/пробирку)	87,5	175	262,5	350
Реакционная смесь, мкл (7 мкл/пробирку)	35	70	105	140
Смесь ферментов для ОТ, мкл (3,5 мкл/пробирку)	17,5	35,0	52,5	70,0

Тщательно перемешать смесь пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или импульсным вортиксированием 15-20 раз.

4. Внести в приготовленные пробирки **по 28 мкл** полученной рабочей смеси.

5. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами **по 7 мкл**:

- в пробирку **отрицательного контроля ПЦР** – разбавитель;
- в пробирку **отрицательного контрольного образца** – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки **исследуемых образцов** – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку **положительного контрольного образца** - положительный контрольный образец из комплекта набора;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

Внимание! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК! Раствор не хранится!

6. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 15 сек на плашечной центрифуге или микроцентрифуге-вортексе.

7. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«CFX 96» (BioRad)
«Rotor-Gene 6000» (Corbett Research)
«Rotor-Gene Q» (Corbett Research)

+42 °C	25 мин	1 цикл
+95 °C	5 мин	1 цикл
+95 °C	10 сек	40 циклов
+60 °C	25 сек (считывание)	
+72 °C	30 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad)

+42 °C	25 мин	1 цикл
+94 °C	5 мин	1 цикл
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	25 сек (считывание)	
+72 °C	30 сек	

Для прибора LightCycler96				
	Канал	slope	EPF	maxCq (КЦ)
РНК вируса гриппа А Н5 субтипов	FAM	0,01	0,05	38
РНК вируса гриппа А Н7 субтипов	HEX	0,02	0,1	38
Экзогенный ВК	Cy5	0,02	0,1	38

10. Интерпретация результатов:

Ct Fam, Ct Hex – цикл пересечения кривой накопления специфического флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct Cy5– цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца с пороговой линией;

N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

КЦ – конечный цикл – пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией после него, полностью аналогично ситуации, когда пересечение не зарегистрировано вовсе

	Green (РНК ПГА_Н5)	Red (внутренний контроль)	Результат
ПКО Н5_Н7	< КЦ	< КЦ	Специфическая реакция прошла.
	N/A или > КЦ	N/A	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- ПЦР	N/A или > КЦ	N/A или >КЦ	Специфическая контаминация и контаминация внутренним контролем отсутствует.
	< КЦ	N/A или >КЦ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	N/A или > КЦ	< 30	Контаминация внутренним контролем. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- выделения	N/A	< КЦ	Специфическая контаминация отсутствует
	N/A	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение РНК
	< КЦ	< КЦ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки
Анализируемый образец	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	N/A или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	N/A или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение РНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца с этапа выделения

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. **Комплект реагентов для выделения РНК РНК-сорбент-ВЕТ** хранится при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Срок годности – 12 месяцев. Допускается хранение и транспортировка при температуре $+18...+25^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней. При длительном хранении раствор 1 при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ может кристаллизоваться, в таком случае перед использованием его необходимо прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.
2. **Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации** хранится при температуре $-20...-18^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Срок годности – 12 месяцев. Допускается хранение и транспортировка при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ не более 5 дней.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению. Комплекты реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

По всем вопросам обращайтесь в ООО НПФ «ЛИТЕХ».
Почтовый адрес: 107023 Москва, ул. Малая Семёновская, д. 3А, стр.2;
телефон/факс: (495) 258-39-47; email: info@lytech.ru