



Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А и пандемического подтипа Н1 (Н1 pdm) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени»

АмплиПрайм® Грипп А / Н1 pdm

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2017-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



Биотехнологическая
компания

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ | 3 |
| 1. НАЗНАЧЕНИЕ | 4 |
| 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА | 4 |
| 2.1. Состав и комплектность | 4 |
| 2.2. Принцип метода | 5 |
| 3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА | 6 |
| 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 6 |
| 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ | 6 |
| 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ..... | 8 |
| 6.1. Взятие исследуемого материала..... | 8 |
| 6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК..... | 8 |
| 6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов..... | 8 |
| 6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов | 9 |
| 7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ | 10 |
| 7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала | 10 |
| 7.2. Подготовка материала к исследованию..... | 11 |
| 8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 12 |
| 8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала | 12 |
| 8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР..... | 12 |
| 8.3. Внесение проб РНК, проведение амплификации и детекции | 13 |
| 8.4. Анализ и обработка результатов..... | 14 |
| 8.5. Используемые настройки амплификаторов | 14 |
| 8.6. Интерпретация результатов | 15 |
| 8.7. Возможные ошибки | 19 |
| 9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА..... | 17 |
| 9.1. Предел обнаружения | 17 |
| 9.2. Аналитическая специфичность..... | 17 |
| 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА..... | 18 |
| 10.1. Срок годности | 18 |
| 10.2. Транспортирование..... | 18 |
| 10.3. Хранение | 18 |
| 11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ..... | 18 |
| 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ | 19 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|--------|--|
| Сt | Cycle threshold (пороговый цикл) |
| ВКО | внутренний контрольный образец |
| РНК | рибонуклеиновая кислота |
| ДНКаза | дезоксирибонуклеаза |
| РНКаза | рибонуклеаза |
| дНТФ | дезоксирибонуклеозидтрифосфаты |
| ОКО | отрицательный контрольный образец, отрицательный контроль экстракции |
| ОТ-ПЦР | полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией |
| К- | отрицательный контроль ПЦР |
| ПК | положительный контроль |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| УДГ | урацил-ДНК-гликозилаза |

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А и пандемичного подтипа Н1 (Н1 pdm) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Грипп А/Н1 pdm».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Грипп А/Н1 pdm», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Грипп А/Н1 pdm» (далее по тексту - набор) предназначен для качественного определения РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) и пандемического подтипа Н1 (Н1 pdm) методом мультиплексной ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

РНК вируса гриппа А (*Influenza virus A*) выявляют в биологическом материале (при исследовании птиц: помет, мазки из клоаки, ротоглотки и трахеи, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек, яйцо, аллантоисная жидкость эмбрионов кур; при исследовании свиней и лошадей: мазки из носоглотки, ткань трахеи и легких), мясе птиц, свиней, лошадей и субпродуктах, мазках с поверхности мяса, субпродуктов и в комбикормах.

РНК пандемического подтипа Н1 вируса гриппа А выявляют в биологическом материале, отобранном от свиней (мазках из носоглотки, ткани трахеи и легких). Набор используется в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в инструкции по применению набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции РНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

| Реагент | Объем, мл | Количество | Описание |
|-----------------------------|-----------|------------|--|
| ПЦР-смесь Грипп А/Н1 pdm | 1,10 | 1 пробирка | Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость. |
| Буфер В | 0,70 | 1 пробирка | Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость. |
| Ревертаза R | 0,055 | 1 пробирка | Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость. |
| ПКО Грипп А/Н1 pdm | 0,26 | 1 пробирка | Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость. |
| К- | 0,30 | 1 пробирка | Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость. |

Комплектность набора

| Компонент | Формат | Количество |
|--|---|------------|
| Набор реагентов | - | 1 |
| Инструкция по применению набора | в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/ | 1 |
| Краткое руководство по применению набора | в бумажном виде | 1 |
| Паспорт качества на набор | в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/passport/ | 1 |
| Вкладыш для автоматической обработки результатов | в бумажном виде | 1 |

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹ и проведении реакции обратной транскрипции РНК и одновременной амплификации участков кДНК вируса гриппа А и пандемического подтипа Н1 вируса гриппа А при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участок кДНК гриппа А, кДНК пандемического подтипа Н1 вируса гриппа А и последовательность ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | FAM | R6G ² | Cy5 |
|----------------------|----------------------|--|---|
| кДНК-мишень | кДНК вируса гриппа А | кДНК подтипа Н1 (Н1 pdm) вируса гриппа А | ВКО В |
| Область амплификации | Ген М | Ген НА | Искусственно синтезированная последовательность |

¹ ВКО В входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала.

² Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® Грипп А/Н1 pdm» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для ветеринарных и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® Грипп А/Н1 pdm» возможно ОТ-ПЦР-исследование только проб РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО В», входящим в состав набора для проведения экстракции НК. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

4.6. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ОТ-ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1 Иглы со стерильным шприцем или пастеровская пипетка с фильтром.

6.1.2 Металлические инструменты (скальпели, ножницы и т.п.).

6.1.3 Анатомический пинцет.

6.1.4 Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек ротовой и носовой полостей или сухие стерильные зонды с ватными тампонами.

6.1.5 Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант или стерильный физиологический раствор.

6.1.6 Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл.

6.1.7 Пакеты и емкости для отбора, транспортирования и хранения полуфабрикатов, продуктов питания, однократного применения (Zip-Lock пакеты).

6.1.8 Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2.2. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.3. Фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.4. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор.

6.2.5. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.

6.2.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции РНК/ДНК «МагноПрайм ВЕТ» («Формат 96») или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор Производителя, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала (при исследовании птиц: помет, мазки из клоаки, ротоглотки и трахеи, тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек, яйцо, аллантоисная жидкость эмбрионов кур; при исследовании свиней и лошадей: мазки из носоглотки, ткань трахеи и легких), мясе птиц, свиней, лошадей и субпродуктах, мазках с поверхности мяса, субпродуктов и в комбикормах для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- состав набора включает реагенты ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной РНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции РНК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм ВЕТ» формы выпуска «Формат Контроли». Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2.Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции РНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции РНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1.Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов:

- плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,6 мл или 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2.Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3.Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5.Центрифуга-вортекс.

6.4.6.Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7.Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | Длины волн, нм | | | |
|----------------------|----------------|----------|----------|----------|
| | Возбуждения | | Детекции | |
| | Минимум | Максимум | Минимум | Максимум |
| FAM | 450 | 470 | 510 | 530 |
| R6G | 515 | 532 | 545 | 580 |
| Cy5 | 620 | 640 | 660 | 690 |

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- скорость нагрева не менее 2°C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1°C/сек.

6.4.8.Холодильник с морозильной камерой от минус 24 °C до минус 16 °C.

6.4.9.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.10.Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

При исследовании птиц материалом для исследования служат:

- мазки из клоаки, ротоглотки и трахеи;
- помет;
- тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких, селезенки, головного мозга, воздухоносных мешков, кишечника, сердца, почек;
- яйцо;
- аллантаисная жидкость куриных эмбрионов;
- пробы мяса, продуктов переработки, субпродуктов;
- мазки с поверхности мяса, субпродуктов;
- корм.

При исследовании свиней и лошадей материалом для исследования служат:

- мазки из носоглотки;
- тканевой (аутопсийный) материал трахеи и легких;
- пробы мяса, продуктов переработки, субпродуктов;
- мазки с поверхности мяса, субпродуктов;
- корм.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах.

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

От каждого стада птицы отбирают для исследований 5 – 10 трупов или патологический материал от 5 – 10 трупов, клоакальные и/или трахеальные смывы от 10 – 15 голов, 1 – 10 сборных проб помета от стада.

Пробу помета рекомендуется отбирать из расчета 1 грамм помета на 60 точек птичника (выгула или вольеры), выбранных по диагонали крест-накрест. Помет (1-5 г) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Мазки из клоаки, со слизистой глотки и трахеи, из носоглотки, с поверхности мяса, субпродуктов берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора или в пробирку с транспортной средой (конец отламывают, чтобы пробирку можно было закрыть).

Тканевой материал (трахея, легкие, селезенка, головной мозг, воздухоносные мешки, кишечник, почки, сердце), мясо и субпродукты помещают в стерильные пластиковые контейнеры.

При исследовании **яиц** в скорлупе прокалывают отверстие иглой со стерильным шприцем или пастеровской пипеткой с фильтром и отбирают в пробирку объемом 1,5 мл 1,0-1,5 мл яичного белка. При исследовании **куриных эмбрионов** в скорлупе прокалывают отверстие иглой со стерильным

шприцем или пастеровской пипеткой с фильтром и отбирают в пробирку объемом 1,5 мл 1,0-1,5 мл аллантоисной жидкости.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре 2 – 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Несоблюдение требований может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Из помета (1 – 5 г) готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Взвесь помета декантируют в течении 5 – 10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5 000 об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf (или используют аналог), в течение 5 мин. Экстракцию РНК из осветленного экстракта помета проводят сразу или замораживают.

Корм для исследования тщательно гомогенизируют. Готовят ~10% (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе, тщательно ресуспендируют. Супернатант переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин. Для экстракции РНК отбирают 100 мкл надосадочной жидкости.

Образцы мазков, яичного белка, аллантоисной жидкости не требуют предварительной подготовки.

Тканевой материал, мясо птицы, свинину, конину и субпродукты гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят ~10% (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс. об/мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость используют для экстракции РНК.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75%.

8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции РНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁴ в одном повторе. При проведении экстракции образцов, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В)⁴.

В процессе экстракции РНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁵ – **100 мкл** в пробирку для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО В – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции РНК, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ») или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм ВЕТ» или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Грипп А/Н1 pdm, Ревертазы R и Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

³ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁴ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁵ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

| Реагент | Объем, мкл | Обозначения |
|----------------------------|------------|---|
| ПЦР-смесь Грипп А / Н1 pdm | 10,0*(N+1) | N – количество образцов РНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли |
| Буфер В | 5,0*(N+1) | |
| Ревертаза R | 0,5*(N+1) | |

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Грипп А / Н1 pdm**, **Ревертазой R** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб РНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб РНК**.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ПКО Грипп А / Н1 pdm**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------------------|-------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | – | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM, R6G ⁶ , Cy5 | |

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX и JOE, Yellow.

Примечание: рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых (см. п. 8.5.) зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 3-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

| Канал для флуорофора | FAM | R6G ^b | Cy5 |
|----------------------|----------------------|--|-------|
| Продукт амплификации | кДНК вируса гриппа А | кДНК подтипа Н1 (Н1 pdm) вируса гриппа А | ВКО В |

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Рекомендуемые настройки для приборов указаны в таблицах 8 - 10.

Таблица 8

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

| Канал | Опт. уровня сигнала | Порог | Устранение выбросов | Коррект. уклона | Динамический фон | Исключить циклы |
|------------|---------------------|-------|---------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| FAM/Green | от 5 FI до 10 FI | 0,03 | 10 % | включена | включен | от 1 до 5 |
| JOE/Yellow | от 5 FI до 10 FI | 0,03 | 10 % | включена | включен | от 1 до 5 |
| Cy5/Red | от 5 FI до 10 FI | 0,03 | 10 % | включена | включен | от 1 до 5 |

При запуске прибора роторного типа в окне «Автооптимизация уровня сигнала» активировать функцию «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции».

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

| Канал | Threshold / Порог | Исключить циклы |
|-------|--|-----------------|
| FAM | Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 - 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «ПКО Грипп А / H1 pdm» в последнем цикле амплификации. | от 1 до 5 |
| HEX | | |
| Cy5 | Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОКО в последнем цикле амплификации. | от 1 до 5 |

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 10.

Таблица 10

Настройки для прибора «CFX96»

| Параметр | Шаг этапа циклирования | Скорость нагревания/охлаждения |
|--------------|------------------------|--------------------------------|
| Step Options | 95 °C | 2,5 °C/sec |
| | 60 °C | 2,5 °C/sec |

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 12. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 11 и 12 соответственно.

Таблица 11

Критерии валидности для контрольных образцов

| Контроль | Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора | | |
|---|--|--------------------|---------------------------|
| | FAM | R6G | Cy5 |
| ОКО (отрицательный контроль экстракции) | Отсутствует | Отсутствует | Определено Ct ≤ 25 / ≤ 28 |
| К- (отрицательный контроль ПЦР) | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует |
| ПКО Грипп А/Н1 pdm (положительный контроль) | Определено Ct ≤ 35 | Определено Ct ≤ 34 | Отсутствует |

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

| Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов) | Интерпретация |
|---|--|
| Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX отсутствуют , при этом значение Ct по каналу для флуорофора Sy5 определено . | РНК вируса гриппа А и РНК вируса гриппа А подтипа H1pdm не обнаружены |
| Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. | РНК вируса гриппа А обнаружена |
| Значение Ct по каналу для флуорофора FAM и R6G определено . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. | РНК вируса гриппа А подтипа H1pdm обнаружена |
| Значение Ct по каналу для флуорофора Sy5 отсутствует , при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и R6G отсутствуют . | Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ |

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, R6G и Sy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

8.7.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.7.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM, R6G и Sy5, что является невалидным результатом и свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку (если требуется) и исследование образца.

8.7.5. Для исследуемого образца значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM отсутствует, а по каналу для флуорофора R6G определено. Результат сомнительный. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа отбора проб.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Грипп А/Н1 pdm» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет 1×10^3 копий/мл. Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты РНК вируса гриппа А и подтипа Н1 pdm вируса гриппа А.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК вирусов и микроорганизмов (см. таблицу 13). НК вирусов и микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл, а также образцы НК, выделенные из проб крови, смывов с носовой и ротовой полостей, от клинически здоровой птицы вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемый с помощью набора вирус гриппа А. Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми мишенями.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

| Микроорганизмы и вирусы | |
|--|---------------------------------------|
| <i>Influenza B</i> | <i>Mycoplasma synoviae</i> |
| <i>Influenza C</i> | <i>Mycoplasma meleagridis</i> |
| <i>Newcastle disease virus (NDV)</i> | <i>Mycoplasma iowae</i> |
| <i>Avian infectious bronchitis virus (IBV)</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Avian paramyxovirus 1</i> | <i>Streptococcus capsulatus</i> |
| <i>Avian paramyxovirus 2</i> | <i>Haemophilus gallinarum</i> |
| <i>Gallid alphaherpesvirus 1 (GaHV-1)</i> | <i>Salmonella pullorum-gallinarum</i> |
| <i>Pasteurella multocida</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| <i>Mycoplasma gallisepticum</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> |

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов, а также выявляемых набором мишеней с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Допускается транспортирование не более 5 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от -24 до -16 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Грипп А / Н1 pdm, Ревертазы R и Буфера B, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® Грипп А / Н1 pdm» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Код партии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению