

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук (ИМБ РАН)



А.А. Макаров
2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСОВ ГРИППА А И В, СУБТИПИРОВАНИЯ
ВИРУСОВ ГРИППА А И ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ,
ВКЛЮЧАЯ ДЕТЕРМИНАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТИВОГРИППОЗНЫМ
ПРЕПАРАТАМ, МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ
МИКРОЧИПЕ (БИОГРИПП)



ФГБУН Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук (ИМБ РАН),
Российская Федерация, 119991,
г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Наименование Набора

Набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А и В, субтипирования вирусов гриппа А и идентификации генетических маркеров, включая детерминанты устойчивости к противовирусным препаратам, методом гибридизации на биологическом микрочипе (БИОГРИПП)

1.2 Набор реагентов БИОГРИПП предназначен для многопараметрического анализа генома вируса гриппа, включающего

- идентификацию РНК вируса гриппа;
- субтипирование вируса гриппа (тип А или тип В);
- определение вариантов гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа А;
- идентификацию генетических маркеров патогенности и устойчивости к противовирусным препаратам:
 - генетических маркеров, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к препаратам группы адамантанов (ремантадин и амантадин);
 - генетических маркеров, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к препаратам группы ингибиторов нейраминидазы (озельтамивир) (субтип N1);
 - генетических маркеров, определяющих состояние сайта протеолитического расщепления гемагглютинина, ассоциированного с повышенной патогенностью вируса гриппа А (для субтипов H5 и H7);
 - идентификацию генетических маркеров в рамке считывания вирусного белка PB1-F2, который является одним из ключевых факторов подавления вирусом гриппа иммунного ответа хозяина;
 - генетических маркеров в структуре PDZ-связывающего домена в сегменте NS1, детерминирующего активацию сигнальных систем клетки, обеспечивающих контроль над противовирусным ответом.

1.3 Набор реагентов БИОГРИПП предназначен для качественных определений.

1.4 Исследуемый биологический материал – мазки из полости носа и ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, секционный материал, культура вирусов.

1.5 Набор реагентов БИОГРИПП рассчитан на проведение 100 анализов, включая положительные и отрицательные контроли.

1.6 Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика вирусных инфекций, эпидемиологический надзор, научные исследования.

Набор БИОГРИПП может быть использован в учреждениях медицины и здравоохранения, в том числе в диагностических лабораториях инфекционных больниц и других лечебно-профилактических учреждений, вирусологических лабораториях Центров гигиены и санитарии Роспотребнадзора, в эпидемиологических службах для быстрой расшифровки вспышек гриппа и для мониторинга эпидемиологической обстановки в регионах. Результаты исследования могут быть использованы для назначения рациональной противовирусной терапии.

Набор БИОГРИПП не является самостоятельным диагностическим средством для скрининга вируса гриппа в клинических образцах.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия

2.1.1 Определение типа, субтипа и генетических маркеров вируса гриппа с использованием набора реагентов БИОГРИПП основано на гибридизации амплифицированных фрагментов вирусного генома с соответствующими

олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в ячейках биологического микрочипа (биочипа). Анализ включает следующие этапы:

- (1) выделение РНК из биологического материала;
- (2) реакция обратной транскрипции для получения кДНК с использованием вирусной РНК в качестве матрицы;
- (3) мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с амплификацией фрагментов вирусных сегментов MP, NA, HA, PB1, NS и введением в процессе реакции метки - флуоресцентного субстрата;
- (4) гибридизация флуоресцентно-меченных продуктов на биочипе за счет комплементарного ДНК-ДНК взаимодействия между анализируемыми фрагментами генома вируса гриппа и специфичными олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в микроячейках полиакриламидного геля;
- (5) регистрация и интерпретация результатов гибридизации.

2.1.2 Биочип представляет собой подложку с упорядоченно расположенными гидрогелевыми элементами (192 гидрогелевых элемента), содержащими ковалентно иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, которые обеспечивают гибридизацию со специфическими участками генома вируса гриппа, определяющими тип, субтип и генетические маркеры, включая детерминанты устойчивости к противовирусным препаратам.

2.1.3 Визуализация результатов гибридизации проводится флуоресцентным методом с помощью возбуждения флуоресценции после образования дуплекса между меченым ПЦР-продуктом и иммобилизованными на микрочипе зондами.

2.1.4 Учет результатов гибридизации проводится с использованием Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов. Флуоресцентные сигналы каждой ячейки регистрируются камерой с ПЗС-матрицей и подвергаются оцифровке. Интерпретация результатов осуществляется программно в зависимости от того, с какими из иммобилизованных зондов прошла реакция гибридизации. Специальное программное обеспечение позволяет сравнить флуоресцентные сигналы в ячейках и выдать отчет об отсутствии/наличии генетических маркеров в исследуемой РНК вируса гриппа.

2.2 Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

- а) Комплект № 1 для выделения геномной РНК вируса гриппа, включающий:
- ЛР (лизирующий буфер) – 1 флакон (37,5 мл);
 - РПН (реагент для преципитации нуклеиновых кислот) – 1 флакон (50 мл);
 - РП № 1 (промывочный раствор № 1) – 1 флакон (60 мл);
 - РП № 2 (промывочный раствор № 2) – 1 флакон (37,5 мл);
 - НК-буфер (буфер для растворения нуклеиновых кислот) – 4 пробирки (по 1,6 мл);
 - ВКО (внешний контрольный образец) – 1 пробирка (1,25 мл).

Примечание: для выделения вирусной РНК из биологического материала вместо Комплекта № 1 допускается применение других коммерческих наборов и автоматических роботизированных станций, разрешенных к применению в практике клинико-диагностических лабораторий, например, набор реагентов «Проба НК» ООО «ДНК-Технология», Россия.

- б) Комплект № 2 для подготовки образцов для гибридизации, включающий:
- RT-mix (раствор для проведения реакции обратной транскрипции) – 1 пробирка (1,25 мл);
 - RT-G-mix (смесь реагентов для проведения реакции обратной транскрипции) – 1 пробирка (0,05 мл);

- M-MLV (фермент обратная транскриптаза) – 1 пробирка (0,063 мл);
- ПЦР-буфер (10-кратный буфер для проведения ПЦР) – 1 пробирка (1,5 мл)
- PR-mix1 (водный раствор смеси праймеров 1 для проведения ПЦР) – 1 пробирка (0,125 мл);
- PR-mix2 (водный раствор смеси праймеров 2 для проведения ПЦР) – 1 пробирка (0,125 мл);
- PR-mix3 (водный раствор смеси праймеров 3 для проведения ПЦР) – 1 пробирка (0,125 мл);
- UNG (фермент урацил ДНК-гликозилаза) – 1 пробирка (0,07 мл);
- Taq (фермент Taq-полимераза) – 1 пробирка (0,18 мл);
- дНТФ (водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов для проведения ПЦР) – 1 пробирка (1,5 мл);
- ФС (флуоресцентно-меченный субстрат) – 1 пробирка (0,07 мл);
- MQ (вода деионизованная) – 3 пробирки (2,0 мл);
- K+ (положительный контрольный образец) – 1 пробирка (1,6 мл);
- K- (отрицательный контрольный образец) – 1 пробирка (1,6 мл).

Примечание: для проведения обратной транскрипции допускается применение других коммерческих наборов, основанных на обратной транскрипции с рандомными праймерами, разрешенных к применению в практике клинико-диагностических лабораторий, например, набор реагентов «РЕВЕРТА-L» производства ФГБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

в) Комплект № 3 для проведения гибридизации на биологическом микрочипе, включающий

- ГБ (буфер для гибридизации) – 2 пробирки (по 1,5 мл).

г) Комплект № 4 включает биологические микрочипы, каждый из которых рассчитан на проведение одного анализа (гибридизации) – 100 шт. (10 коробок x 10 шт.).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Набор реагентов БИОГРИППИ осуществляет:

- выделение РНК из биологического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки, аспираты из трахеи, бронхоальвеолярный лаваж, промывные воды бронхов, секционный материал, культура вирусов);
- идентификацию РНК вируса гриппа и определение типовой принадлежности вируса гриппа: тип А, тип В;
- субтипирование вируса гриппа А с определением 16 молекулярных вариантов гена гематтлотинина (Н1-Н16) и 9 молекулярных вариантов гена нейраминидазы (N1-N9);
- молекулярный анализ генетических маркеров, включающих:
 - генетические маркеры S31N, V27A, A30T, L26F в гене М2 вирусного сегмента МР, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к препаратам группы адамантанов (ремантадин и амантадин).
 - генетический маркер Н274Y в гене нейраминидазы субтипа N1, ассоциированный с лекарственной устойчивостью к препаратам группы ингибиторов нейраминидазы (озельтамивир);
 - генетический маркер, определяющий состояние сайта протеолитического расщепления гематтлотинина, ассоциированного с повышенной патогенностью вируса гриппа А для субтипов Н5 и Н7;
 - генетические маркеры, определяющих наличие мутации N66S, а также стоп-кодонов (в 12 положении, в 58 положении) в рамке считывания вирусного белка РВ1-Р2;

– генетические маркеры в структуре PDZ-связывающего домена в сегменте NS1, детерминирующего активацию сигнальных систем клетки, обеспечивающих контроль над противовирусным ответом (длину белка NS1 («length variation range») LVT0, LVT-11, LVT -13, последовательности аминокислот RSKV(низкопатогенный вариант, (нпв)), RSEV(нпв), KSEV(высокопатогенный вариант, (впв)), ESEV(впв), ESKV(впв), EPEV(впв)).

3.2 Набор обеспечивает проведение многопараметрического анализа с использованием флуоресцентной детекции гибридизационных сигналов от амплифицированных участков ДНК вируса гриппа, полученной при проведении реакции обратной транскрипции РНК вируса, и иммобилизованных на биочипе олигонуклеотидных зондов.

3.3 Аналитическая чувствительность набора для идентификации вируса и определения его типа составляет $5 \cdot 10^2$ геном-эквивалентов вируса гриппа (количество копий в одной реакционной пробирке при проведении ПЦР).

3.4 Диагностическая специфичность и чувствительность при идентификации вируса и определения его типа, субтипа и профиля генетических маркеров в клинических образцах составляют не менее 98,5% и 85,5% соответственно (оценка функциональных характеристик осуществлялась путем сопоставления с данными анализа клинических образцов с помощью аттестованных наборов реагентов, а также на основе анализа музейных тест-штаммов).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (п. 9.3 приказа МЗ РФ № 4н от 6.06.2012 г.).

4.2 К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

4.3 Работу с набором реагентов следует проводить в ПЦР лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней. Необходимо соблюдать требования документов СанПиН 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», 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 МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4 Разлитые образцы и реактивы следует убирать и дезинфицировать в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.5 Неиспользованные и использованные реактивы, а также реактивы с истекшим сроком годности следует утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6 Анализ должен проводиться в отдельных помещениях (зонах). Выделение РНК следует проводить в зоне I, обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию – в зоне II,

гибридизацию и анализ результатов – в зоне III. Недопустимо возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

4.7 Подготовку реакционных смесей для проведения ПЦР следует проводить в ламинарном шкафу (ПЦР-боксе).

4.8 Раствор РП №1 содержит этанол – легко воспламеняемое вещество. Раствор РП №2 содержит ацетон – легко воспламеняемое вещество. При использовании необходимо соблюдать меры предосторожности.

4.9 Растворы ЛР и ГБ содержат гуанидин изотиоцианат – является вредным компонентом. При использовании необходимо соблюдать меры предосторожности. В случае контакта с кожей и глазами немедленно промыть большим количеством воды.

4.10 По окончании работы использованные материалы и рабочее место должны быть продезинфицированы. Дезинфекцию проводят, помещая инструменты и материалы на 20-24 ч в емкость, содержащую один из дезинфицирующих растворов:

- 10 % раствор хлорной извести,
- 5 % раствор хлорамина Б;
- 6% раствор перекиси водорода.

4.11 Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых стерильных наконечников для полуавтоматических пипеток с фильтром (аэрозольным барьером).

4.12 Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

4.13 При удалении отходов после проведения ПЦР-амплификации, нанесения ПЦР-продуктов на биочипы, удаления реакционной смеси из камер биочипов (пробирок, содержащих ПЦР-продукты, наконечников после контакта с ПЦР-продуктами) следует избегать разбрызгивания растворов, так как это может привести к контаминации лабораторной зоны продуктами ПЦР. Все использованные пробирки и наконечники, имеющие контакт с ПЦР-продуктами, должны немедленно сбрасываться в емкость с дезинфицирующим раствором.

4.14 Ламинарный шкаф (бокс), поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР и работы с использованием биочипов, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовой лампой с максимумом излучения в области 260 нм в течение 1 ч.

4.15 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

4.16 Набор следует применять строго по назначению, согласно данной инструкции.

4.17 Не допускается использовать набор и его компоненты по истечении срока годности.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Выделение РНК (зона I).

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты, например, бокс СЛШ-1,8 АМ (Мясский завод медицинского оборудования), бокс БАВп-01–«Ламинар-С» 1,8 (220.180) (Ламинарные системы), бокс фирмы Babcok, Германия;

– микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14000 об/мин, например, MiniSpin Eppendorf;

– мини-центрифуга/вортекс для микропробирок (2000 об/мин)/ встряхиватель вихревой для микропробирок, например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия;

- термостат для микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,5 и 1,5 мл, поддерживающий температуру до плюс $95,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, например, «Гном», «ДНК-Технология», Россия;
- пипетки полуавтоматические одноканальные, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 1000 мкл,;
- наконечники пластиковые стерильные с аэрозольным барьером для дозирования жидкостей объемом от 10 до 1000 мкл с маркировкой DNase, RNase free;
- пробирки пластиковые стерильные типа «Эппендорф» с маркировкой DNase, RNase free вместимостью 0,5 и 1,5 мл с крышками;
- штатив для микропробирок;
- холодильник, поддерживающий температуру от $+2$ до $+8^\circ\text{C}$, с морозильной камерой с температурой не выше минус 16°C для выделенных проб РНК;
- отдельный халат, шапочки и одноразовые перчатки;
- емкость с дезинфицирующим раствором.

5.2 Проведение обратной транскрипции и ПЦР (зона II).

- бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) для подготовки ОТ и ПЦР смесей, например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (код 610.100), ЗАО «Ламинарные системы», Россия;
- бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс) для внесения проб, например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (код 610.100), ЗАО «Ламинарные системы», Россия;
- мини-центрифуга/вортекс для микропробирок, позволяющая развивать ускорение до 2000 об/мин / встряхиватель вихревой для микропробирок, например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия;
- ДНК-амплификатор (термоциклер) автоматический, например, «C1000», «Biorad», США;
- пипетки полуавтоматические одноканальные, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,1 до 200 мкл;
- наконечники пластиковые стерильные с аэрозольным барьером для дозирования жидкостей объемом от 0,1 до 200 мкл с маркировкой DNase, RNase free;
- холодильник, поддерживающий температуру от плюс 2 до плюс 8°C , с морозильной камерой с температурой не выше минус 16°C для хранения компонентов ПЦР реакции;
- морозильная камера не выше минус 16°C для хранения образцов кДНК;
- отдельный халат, шапочки и одноразовые перчатки;
- емкость с дезинфицирующим раствором;
- минеральное масло для ПЦР-амплификаторов без горячей крышки.

5.3 Проведение гибридизации и учет результатов (зона III).

- Комплекс универсальный аппаратно-программный (УАПК) для анализа биочипов, ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия;
- бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами (ПЦР-бокс), например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (код 610.100), ЗАО «Ламинарные системы», Россия;
- термостат суховоздушный закрытый, поддерживающий температуру плюс $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, например, Thelco Incubator 2DG; фирма Thelco, США;

- термостат для микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,5 и 1,5 мл, поддерживающий температуру до плюс $95,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, например, «Гном», «ДНК-Технология», Россия;
- мини-центрифуга/вортекс для микропробирок, позволяющая развивать ускорение до 2000 об/мин / встряхиватель вихревой для микропробирок, например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия;
- источник питания для горизонтального электрофореза, например, «Эльф-2» «ООО ДНК-Технология», Россия;
- камера для горизонтального электрофореза, например, SE-1, Хеликон, Россия;
- система гель-документации, например Gel Doc EQ, Biogad, Италия;
- пипетки полуавтоматические одноканальные, позволяющие отбирать объемы жидкости от 1 до 100 мкл,;
- наконечники пластиковые стерильные с аэрозольным барьером для дозирования жидкостей объемом от 1 до 100 мкл с маркировкой DNase, RNase free;
- пробирки пластиковые стерильные типа «Эппендорф» с маркировкой DNase, RNase free вместимостью 0,5 мл с крышками;
- штатив для микропробирок;
- морозильная камера с температурой не выше минус 16°C для хранения продуктов амплификации;
- лампа ультрафиолетовая с максимумом излучения в области 260 нанометров, например, лампа ДБ-60, Россия;
- отдельный халат, шапочки и одноразовые перчатки;
- емкость с дезинфицирующим раствором;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709–72);
- буфер для электрофореза (например, TAE-буфер).

6 ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

6.1 Мазки из полости носа и ротоглотки. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5000 об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для выделения РНК отобрать 100 мкл образца.

6.2 Бронхоальвеолярный лаваж или промывные воды бронхов. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 10 мин при 10000 об/мин. Отобрать надосадочную жидкость, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендировать осадок. Для выделения РНК отобрать 100 мкл полученной суспензии.

6.3 Секционный материал гомогенизировать с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем приготовить 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе либо фосфатном буфере. Суспензию перенести в пробирку 1,5 мл и центрифугировать при 10000 об/мин в течение 5 мин. Для выделения РНК отобрать 100 мкл надосадочной жидкости.

6.4 Культура вирусов. Растворить 10 мкл культуральной жидкости в 90 мкл деионизированной воды. Для выделения РНК отобрать 100 мкл получившегося раствора.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка реагентов для анализа

7.1.1 Раствор для лизиса ЛР (комплект № 1) (если он хранился при температуре от +2 до +8°C) прогреть при температуре +65°C до полного растворения кристаллов.

7.1.2 Раствор ГБ (комплект № 3) прогреть при температуре +37°C в течение 30 мин перед проведением гибридизации.

7.2 Выделение геномной РНК (комплект № 1)

7.2.1 Отобрать необходимое количество пробирок вместимостью 1,5 мл и промаркировать «1», «2», «3»... «N» (N – число анализируемых образцов). Внести в каждую пробирку по 300 мкл раствора ЛР и по 10 мкл ВКО.

7.2.2 Добавить в пробирки по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером.

7.2.3 Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе в течение 3-5 с и прогреть 15 мин при температуре + 65°C в термостате.

7.2.4 Осадить конденсат центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 с. В каждую пробирку добавить 400 мкл раствора РПН и перемешать пробы на вортексе в течение 3-5 с.

7.2.5 Центрифугировать пробирки при 14000 об/мин в течение 15 мин.

7.2.6 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Добавить к осадку 500 мкл промывочного раствора РП №1, плотно закрыть крышки и 3-5 раз аккуратно перевернуть пробирки.

7.2.7 Центрифугировать пробирки при 14000 об/мин в течение 5 мин.

7.2.8 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки). Добавить к осадку 300 мкл промывочного раствора РП №2, плотно закрыть крышки и 3-5 раз аккуратно перевернуть пробирки.

7.2.9 Центрифугировать пробирки при 14000 об/мин в течение 5 мин.

7.2.10 Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.2.11 Открыть крышки пробирок и высушить осадки при температуре + 65°C в течение 5 мин.

7.2.12 Добавить в пробирки по 50 мкл НК буфера и прогреть пробы при температуре +65°C в течение 10 мин.

7.2.13 Осадить капли центрифугированием пробирок при 1000 об/мин в течение 3-5 с. Полученные препараты РНК использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

7.3 Проведение обратной транскрипции (ОТ) (комплект № 2)

7.3.1 Отобрать необходимое количество пробирок вместимостью 0,2 или 0,5 мл и промаркировать «1_{от}», «2_{от}», «3_{от}»... «N_{от}» (N – число анализируемых образцов).

7.3.2 Приготовить реакционные смеси для проведения ОТ. Подготовить одну микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,5 мл и промаркировать ее «ОТmix»; внести в пробирку следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

RT-mix 10 × (N) мкл;

RT-G-mix 0,4 × (N) мкл;

MMLV 0,5 × (N) мкл,

N- число анализируемых образцов.

7.3.3 Перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

7.3.4 Из реакционной смеси «OTmix» отобрать по 10 мкл в промаркированные пробирки.

7.3.5 Используя наконечник с фильтром, внести в пробирки по 10 мкл раствора РНК анализируемых образцов и закрыть пробирки. Удалить капли со стенок пробирок каплями центрифугированием в течение 10 с при 1000 g.

7.3.6 Инкубировать смеси при температуре +37 °С в течении 60 мин.

7.3.7 Полученные кДНК использовать для постановки ПЦР.

7.4 Проведение ПЦР (комплект № 2)

Примечание. Рекомендуется постановка положительного (K+) контроля на каждую серию из 10 анализируемых образцов.

7.4.1 Для каждого анализируемого образца подготовить по 3 чистых микроцентрифужных пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 мл и промаркировать их «1₁», «1₂», «1₃»; «2₁», «2₂», «2₃»; «3₁», «3₂», «3₃»... «N₁», «N₂», «N₃» (N – число анализируемых образцов). Добавить дополнительные 6 пробирок для положительного и отрицательного контролей и промаркировать их «K+₁», «K+₂», «K+₃», «K-₁», «K-₂», «K-₃». Таким образом, общее количество пробирок для проведения ПЦР при анализе N образцов составит (3N+6).

7.4.2 Приготовить реакционные смеси для проведения ПЦР. Для этого подготовить 3 (три) микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,5 или 1,5 мл (в зависимости от числа образцов) и промаркировать их «M1», «M2» и «M3». В пробирку «M1» внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

MQ	17,1 x (N+3) мкл;
ПЦР-буф	3,0 x (N+3) мкл;
дНТФ	3,0 x (N+3) мкл;
PP-mix1	1,0 x (N+3) мкл;
ФС	0,2 x (N+3) мкл;
Taq	0,5 x (N+3) мкл;
UNG	0,2 x (N+3) мкл.

Общий объем	25 x (N+3) мкл;
-------------	-----------------

N – число анализируемых проб; +3 обозначает увеличение объема с учетом двух контрольных пробирок «K+» и «K-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки).

7.4.3 В пробирку «M2» внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

MQ	17,1 x (N+3) мкл;
ПЦР-буф	3,0 x (N+3) мкл;
дНТФ	3,0 x (N+3) мкл;
PP-mix2	1,0 x (N+3) мкл;
ФС	0,2 x (N+3) мкл;
Taq	0,5 x (N+3) мкл;
UNG	0,2 x (N+3) мкл;

Общий объем	25 x (N+3) мкл.
-------------	-----------------

7.4.4 В пробирку «М3» внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

MQ	17,1 x (N+3) мкл;
ПЦР-буф	3,0 x (N+3) мкл;
дНТФ	3,0 x (N+3) мкл;
PR-mix3	1,0 x (N+3) мкл;
ФС	0,2 x (N+3) мкл;
Taq	0,5 x (N+3) мкл;
UNG	0,2 x (N+3) мкл;

Общий объем	25 x (N+3) мкл.
-------------	-----------------

7.4.5 Внести реакционные смеси в подготовленные по п. 7.4.1 пробирки для проведения ПЦР, по 25 мкл в каждую, таким образом, чтобы смесь «М1» была распределена по пробиркам с индексом «N₁», смесь «М2» – по пробиркам с индексом «N₂», смесь «М3» – по пробиркам с индексом «N₃». Если используется амплификатор без подогрева крышки, добавить в каждую пробирку по 2 капли (~25 мкл каждая) минерального масла.

7.4.6 В пробирки с реакционными смесями внести по 5 мкл раствора кДНК анализируемых образцов, в контрольные пробирки внести по 5 мкл «К+» и «К-». Закрывать пробирки и удалить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 10 с при 1000 g.

7.4.7 Поместить пробирки в ДНК-амплификатор и провести амплификацию, используя приведенный ниже температурно-временной режим (см. Табл. 1).

Таблица 1. Температурно-временной режим проведения ПЦР

Шаг программы	Наименование операции	Температура, °C	Время инкубации, с	Количество циклов
1	Обработка урацил-ДНК-гликозилазы (UNG)	25,0±0,5	600	1
2	Предварительная денатурация ДНК	94,0±0,5	600	1
3	Денатурация ДНК	94,0±0,5	20	30
	Отжиг праймеров	50,0±0,5	30	
	Удлинение праймеров	72,0±0,5	30	
4	Денатурация ДНК	94,0±0,5	20	40
	Отжиг праймеров	70,0±0,5	30	
	Удлинение праймеров	72,0±0,5	30	
5	Завершающая инкубация	72,0±0,5	180	1

7.4.8 Полученные растворы использовать для проведения гибридизации на биочипах. Рекомендуется проводить гибридизацию сразу после проведения амплификации, не допуская длительного хранения образцов.

7.5 Проведение гибридизации на биочипах (комплекты № 3 и № 4).

7.5.1 Приготовить (N+2) пробирок объемом 0,5 мл по количеству анализируемых образцов с учетом двух контрольных пробирок «К+» и «К-». Промаркировать пробирки и биочипы в соответствии с порядковыми номерами анализируемых образцов.

7.5.2 В каждую пробирку внести по 9 мкл раствора ГБ (ГБ во все пробирки можно вносить одним сменным наконечником).

7.5.3 В каждую пробирку внести по 9 мкл реакционных смесей из пробирок с индексами «N₁», «N₂» и «N₃» после стадии ПЦР. В пробирку K+ внести по 9 мкл реакционных смесей из пробирок «K+₁», «K+₂» и «K+₃», в пробирку K- внести по 9 мкл реакционных смесей из пробирок «K-₁», «K-₂» и «K-₃». Если при амплификации использовалось минеральное масло, следует избегать его попадания в наконечник пипетки. Перемешать полученную смесь на вортексе, удалить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 10 с при 1000 g.

7.5.4 Нанести на микрочип по 30 мкл полученной смеси через любое из двух отверстий гибридизационной камеры. При заполнении следует избегать образования воздушных пузырей внутри камеры. Плотно закрыть крышку камеры биочипа.

7.5.5 Поместить биочипы в термостат на +37°C и провести гибридизацию в течение 5 ч – 20ч. Рекомендуется оставлять биочипы в термостате на ночь и регистрировать результаты в начале следующего рабочего дня.

7.5.6 Отмывка биочипов по окончании гибридизации.

7.5.6.1 Удалить реакционную смесь через любое из двух отверстий гибридизационной камеры.

7.5.6.2 Внести в реакционную камеру биочипа 30 мкл дистиллированной воды, прогретой до +37°C. Подождать 1 минуту. Удалить воду. Повторить процедуру.

7.5.6.3 Аккуратно отсоединить гибридизационную камеру от подложки биочипа.

7.5.6.4 Промыть поверхность биочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов, либо над раковиной. Для промывки чипа можно использовать промывалку (пластиковый диспенсер).

7.5.6.5 Поместить подложки биочипа в электрофорезную камеру, заполненную буфером для электрофореза (например, TAE буфер), так, чтобы поверхность биочипа, содержащая гелевые элементы, оказалась погруженной в буфер. Провести электрофорез при 10 В/см в течение 1 мин.

7.5.6.6 Промыть поверхность биочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов, либо над раковиной. Для промывки чипа можно использовать приспособление для промывания (пластиковый диспенсер).

7.5.6.7 Высушить биочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки, особенно в зоне гелевых ячеек биочипа). Высушенные микрочипы использовать для учета результатов гибридизации.

7.5.6.8 По окончании отмывки провести облучение ПЦР-бокса ультрафиолетовым светом в течение не менее 30 мин.

8 РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ГИБРИДИЗАЦИИ

8.1 Результаты гибридизации регистрируют с помощью универсального аппаратно-программного комплекса (УАПК) для анализа изображений диагностических микрочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006). Установка и эксплуатация УАПК осуществляется в соответствии с Руководством по эксплуатации УАПК.

8.2 Произвести запуск программы «Imageware» (файл «imageware.exe»). Переключиться на закладку «Шаблон» в правом верхнем углу окна программы, из списка шаблонов выбрать «BioFlu». На экране монитора появится схема биочипа (Рис. 1). При наведении курсора мыши на ячейки появляются названия находящихся в них зондов.

8.3 Микрочип поместить в держатель УАПК так, чтобы активная область, содержащая элементы геля, оказалась сверху и была ориентирована под оптическую ось прибора.

8.4 Нажать курсором мыши пиктограмму с надписью «две краски».

8.5 Нажать курсором мыши пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части экрана. При этом происходит автоматическое получение флуоресцентных сигналов от элементов микрочипа и автоматический вывод результата (Рис. 2).

8.6 Проанализировать микрочипы, содержащие положительный и отрицательный контроли. Результат гибридизации исследуемых образцов считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации со следующим результатом:

К+ – программа выдает отчет: «вирус гриппа обнаружен, тип А, подтип H3N2, обнаружен умеренно патогенный вирусный белок PB1-F2, обнаружен вариант NS1, характерный для низкопатогенных штаммов»;

К- – программа выдает отчет: «вирус гриппа не обнаружен».

Отсутствие положительных сигналов в пробе с положительным контролем ПЦР К+ может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР заново. Если в отрицательном контроле (К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется предпринять меры по выявлению источника контаминации и повторить анализ проб.

При добавлении ВКО на стадии выделения РНК должны наблюдаться превышающие пороговое значение флуоресцентные сигналы x9y1 и/или x10y1. При их отсутствии рекомендуется повторить анализ, начиная с этапа экстракции РНК.

8.7 Проанализировать микрочипы, содержащие исследуемые образцы. В отчете программы (закладка «Отчет») содержится следующая информация:

«Вирус гриппа не обнаружен» – исследуемый образец отрицательный;

«Вирус гриппа обнаружен» – исследуемый образец положительный;

«Тип вируса гриппа»: А, В;

«Подтип»: гемагглютинин H1 - H16, не определен (Nx); нейраминидаза N1 - N9, не определен (Nx);

«Лекарственная устойчивость» (Табл.2): штамм чувствителен к препаратам группы адамантанов; штамм устойчив к препаратам группы адамантанов (указаны мутации, обуславливающие устойчивость); штамм чувствителен к препаратам группы ингибиторов нейраминидазы; штамм устойчив к препаратам группы ингибиторов нейраминидазы (указана мутация H274Y, обуславливающая устойчивость);

«Детерминанты патогенности» (Табл.3): Вирусный белок PB1-F2 не синтезируется; обнаружен умеренно патогенный вирусный белок PB1-F2; обнаружен высокопатогенный вирусный белок PB1-F2 (указана мутация N66S, характеризующаяся высокой патогенностью); Состояние вирусного белка PB1-F2 не определено;

Обнаружен вариант NS1, характерный для низкопатогенных штаммов; обнаружен вариант NS1, характерный для высокопатогенных штаммов (указана последовательность аминокислот, характеризующаяся высокой патогенностью); Вариант NS1 не определен;

Сайт расщепления гемагглютинина высокопатогенный (HPAI). Сайт расщепления гемагглютинина низкопатогенный (LPAI) (для субтипов H5 и H7).

8.8 Оператор может визуально проконтролировать флуоресцентное изображение на биологическом микрочипе. Для этого после завершения процедуры автоматической интерпретации результатов следует переключиться на закладку «Снимок» в правой части экрана и визуально проконтролировать автоматическое наложение сетки на изображения ячеек микрочипа (Рис. 1). В случае некорректного наложения сетки следует «протащить» мышкой левый нижний и правый нижний элементы сетки до соответствующих ячеек микрочипа. При этом сетка должна полностью наложиться на изображение микрочипа. После этого следует переключиться на закладку «Отчет» и снова проверить выдаваемые программой результаты.

Таблица 2 Генетические маркеры лекарственной устойчивости.

		Мутации									
		в гене M2 сегмента МР								в гене NA	
		S31N		V27A		L26F		A30T		H274Y	
Текст отчета по лекарственной устойчивости	Суб-тип NA	S	N	V	A	L	F	A	T	H	Y
- штамм чувствителен к препаратам группы адамантанов		•	○	•	○	•	○	•	○		
- штамм устойчив к препаратам группы адамантанов		○	•								
				○	•						
						○	•				
								○	•		
- штамм чувствителен к препаратам группы ингибиторов нейраминидазы	N2-N9										
	N1									•	○
- штамм устойчив к препаратам группы ингибиторов нейраминидазы	N1									○	•

• - преобладающий флуоресцентный сигнал в группе

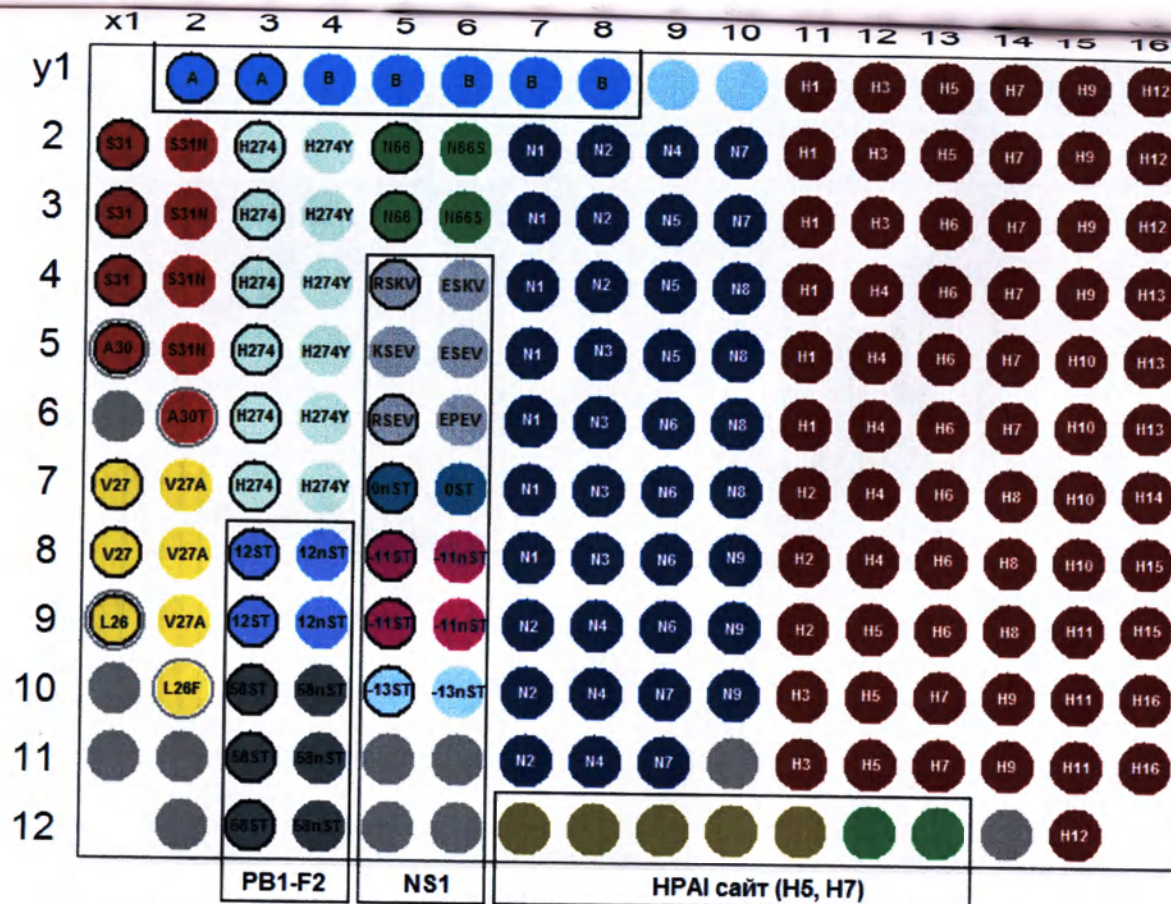


Рис. 1. Схема биочипа, входящего в состав тест-системы «БИОГРИПП».

A, B – ячейки для определения типа вируса гриппа: тип A или тип B;

N1 –N9 – ячейки для определения субтипа нейраминидазы вируса гриппа A;

H1- H16 – ячейки для определения субтипа гемагглютинина вируса гриппа A;

S31, A30, V27, L26, H274, N66 – ячейки для определения генетических маркеров вируса гриппа A, связанных с патогенностью и устойчивостью к противовирусным препаратам;

Блок PB1-F2 – ячейки для определения стоп-кодонов в рамке считывания вирусного белка PB1-F2;

Блок NS1 – ячейки для определения стоп-кодонов и структуры вирусного белка NS1;

Блок HPAI – ячейки для анализа структуры сайта HPAI.

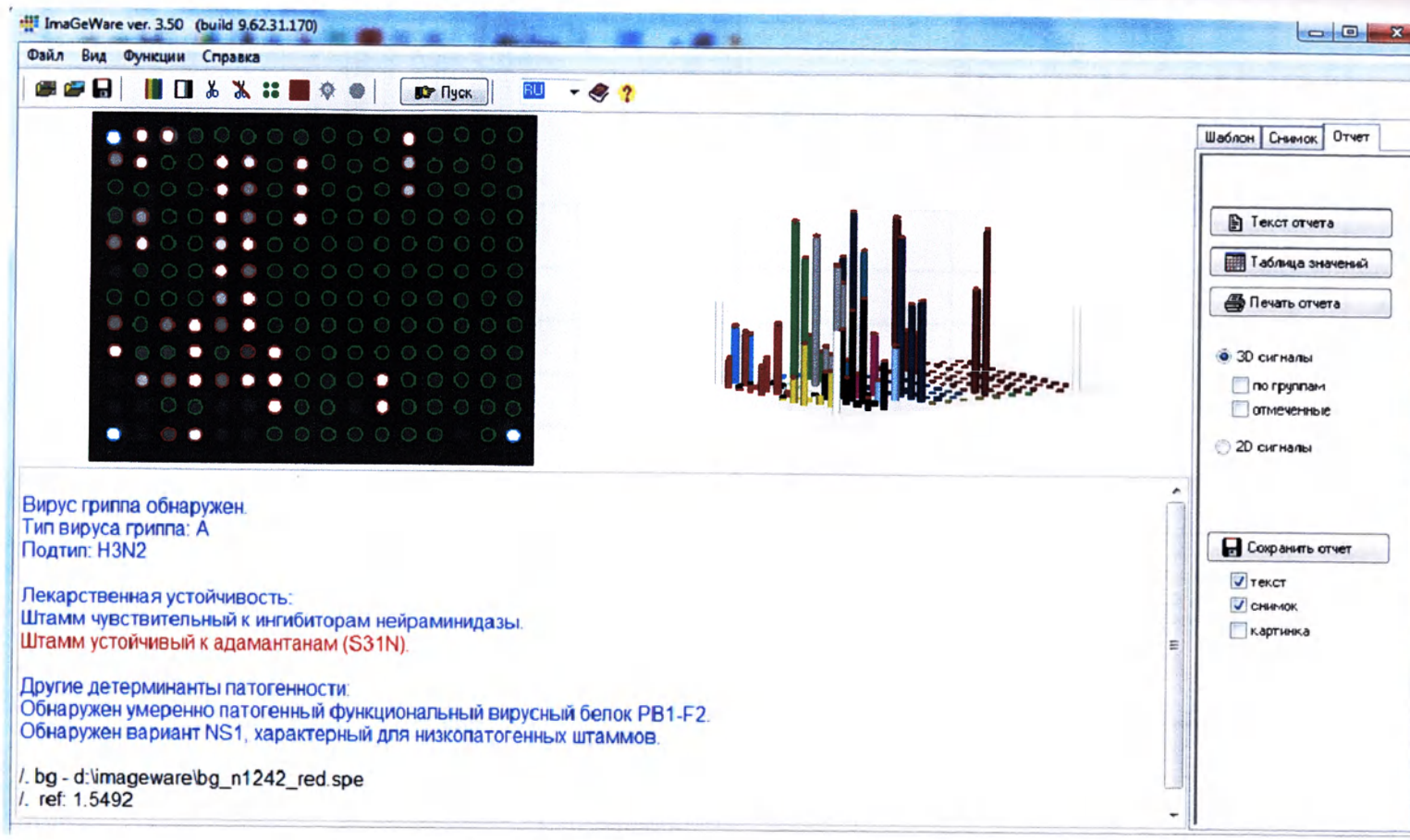


Рис. 2. Диалоговое окно режима «Отчет» программы при проведении анализа с использованием набора реагентов БИОГРИПП.

Табл. 3. Генетические маркеры патогенности.

Табл. 3. Генетические маркеры патогенности.																						
Текст отчета по терминантам патогенности	HA		PB						NS													
	субтип	HPIA1-сайт	Стоп кодоны				LVT (length variation range)				Структура аминокислот PDZ-домена											
			12ST		58ST		N665		-13ST		-11ST		0ST									
			есть	нет	есть	нет	N	S	есть	нет	есть	нет	есть	нет	RSKV+	RSEV+	KSEV-	ESEV-	ESKV-	EPEV-		
вирусный белок B1-F2 не синтезируется			•	○																		
обнаружен умереннопатогенный вирусный белок B1-F2			○	•	○	•	•	○														
обнаружен высокопатогенный вирусный белок B1-F2			○	•	○	•	○	•														
вариант NS1 низкопатогенный									•	○												
											•	○										
													○	•								
									○	•	○	•	•	○	•	○	○	○	○	○		
									○	•	○	•	•	○	○	•	○	○	○	○		
вариант NS1 высокопатогенный									○	•	○	•	•	○	○	○	•	○	○	○		
									○	•	○	•	•	○	○	○	○	•	○	○		
									○	•	○	•	•	○	○	○	○	○	•	○		
									○	•	○	•	•	○	○	○	○	○	○	•		
сайт расщепления гемагглютинина высокопатогенный	H5 H7	•																				
сайт расщепления гемагглютинина низкопатогенный	H5 H7																					

• - преобладающий флуоресцентный сигнал в группе.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:

комплекты № 1 и № 3 – при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора; допускается хранение комплектов № 1 и № 3 при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 3 сут;

комплект № 2 – при температуре минус 20°C в течение всего срока годности набора;

комплект № 4 – при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение всего срока годности набора.

9.2. Срок годности набора 6 мес.

9.3. Все реагенты после вскрытия флаконов и пробирок могут храниться не более 2-х мес. при условиях, указанных в п. 9.1.

По вопросам, касающимся качества набора БИОГРИПП, следует обращаться в Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, тел. 8 (499) 135-98-46.

Н.с. лаборатории биологических
микрочипов ИМБ РАН, к.б.н.

Е.Е. Фесенко

Всего прошито и скреплено

18 (восемнадцать) (цифрами и прописью) листов

[Handwritten signature]

Директор ИМБ РАН,
проф. А.А.

