

## Инструкция по применению

### НАБОРА ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ И ИНДИКАЦИИ КИШЕЧНЫХ ВИРУСОВ В ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ МЕТОДОМ ПЦР

Набор предназначен для выявления норо- и энтеровирусной контаминации питьевой воды путем изоляции вирусов в проточной системе с помощью адсорбции на волокнистом адсорбирующем картридже и элюции малым объемом элюирующего буфера с последующей индикацией норо- и энтеровирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

Набор выпускается в комплекте, достаточном для проведения исследований 10 проб питьевой воды и состоит из 2-х частей:

Комплект №1 для изоляции вирусов в проточной системе:

1	Фильтрационное устройство	1 шт.
2	Адсорбирующий картридж	10 шт.
3	Концентрат элюирующего буфера (10х)	1х50 мл

Комплект №2 для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени включает следующие реактивы в количестве, достаточном для проведения 12 реакций в отношении каждого из типов вируса (норо- и энтеровирусов) :

1	ПЦР-смесь №1	1х260 мкл
2	ПЦР-смесь №2 «норо»	1х70 мкл
3	ПЦР-смесь №2 «энтеро»	1х70 мкл
4	Тақ-полимераза (5ед/мкл)	1х15 мкл
5	Положительная контрольная проба ПЦР норовирус («K <sup>+</sup> норо»)	1х15 мкл
6	Положительная контрольная проба ПЦР энтеровирус («K <sup>+</sup> энтеро»)	1х15 мкл
7	Отрицательная контрольная проба ПЦР («ПЦР K <sup>-</sup> »)	1х30 мкл
8	Масло минеральное	300 мкл

Для проведения исследований с помощью набора дополнительно используют следующие реактивы, не входящие в его состав:

- Хлороформ любой марки,  $\geq 99,5\%$ ;
- Набор для выделения вирусной РНК – любой марки;
- Набор для обратной транскрипции – любой марки;
- Смесь случайных гексануклеотидов – любой марки.

#### 1. Общие правила отбора проб с использованием Комплекта №1.

Отбор проб осуществляют в халате и резиновых перчатках. После окончания работы перчатки обрабатывают спиртом, а халаты стерилизуют. Пробы маркируют, указывая населенный пункт, точку отбора, дату (число, месяц, год), должность и Ф.И.О. производившего отбор. Материал доставляют в лабораторию в максимально короткий срок (не более 6 часов). Доставленный материал немедленно обрабатывают. В порядке исключения допускается его хранение при температуре  $(6 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  одни сутки. Каждую пробу регистрируют в рабочем журнале.

#### 3. Подготовка к работе и установка фильтрационного устройства.

Перед использованием в фильтрационное устройство вставляют адсорбирующий картридж (см. рис.1), после чего его заворачивают в бумагу для стерилизации и стерилизуют сухим жаром при температуре  $80-85^{\circ}\text{C}$  45 мин. Фильтрационное устройство со

вставленным картриджем доставляют на место отбора в стерильной упаковке. После трехкратного обжигания водопроводного крана и спуска воды в течение 15 мин устанавливается скорость ее протекания 40-45 л/ч (1 л за  $\approx$  1,5 мин). Такая скорость обеспечивает протекание через фильтрационное устройство 1000 л воды за 24 часа. После установления необходимой скорости протекания воды адсорбирующий картридж извлекают из стерильной упаковки, откручивают шайбу насадки на кран до упора, вставляют кран в насадку и фиксируют фильтрационное устройство на кране, зажимая шайбу. После фиксации фильтрационного устройства на кране оставляют его на 24 часа в токе воды для улавливания вирусов. Спустя 24 часа фильтрационное устройство помещают в стерильный пакет и доставляют в вирусологическую лабораторию. После извлечения адсорбирующего картриджа использованное фильтрационное устройство подвергают обеззараживанию в 3% растворе перекиси водорода в течение 12 часов, затем многократно (не менее 10 раз) промывают в проточной воде и высушивают для последующей стерилизации и повторного использования.



#### 4. Обработка проб и концентрирование вирусов.

Элюирование вирусов с адсорбирующего картриджа осуществляют с помощью элюента, концентрат которого разводят в стерильной дистиллированной воде, как указано в п.1 настоящей Инструкции. Адсорбирующий картридж в стерильных условиях извлекают из фильтра-поглотителя, помещают в стерильный лабораторный стакан и заливают 50 мл элюента и инкубируют в течение 15-30 мин при комнатной температуре, помешивая каждые 2-3 мин. После этого аккуратно отжимают адсорбирующий картридж стерильным пинцетом и извлекают его из элюента. Использованный адсорбирующий картридж подвергают дезинфекции 3% раствором перекиси водорода, а затем утилизируют. Жидкую фракцию (элюат) переносят в стерильный флакон. Для удаления бактериальной флоры элюат обрабатывают хлороформом в соотношении 1/2 (объем пробы/объем хлороформа). Полученную смесь встряхивают в течение 10 минут на шуттель-аппарате, а затем центрифугируют при 2000 об/мин 10 минут. После центрифугирования верхнюю фазу осторожно отбирают с помощью пипетки в стерильный флакон, а затем исследуют с использованием Комплекта №2.

Для увеличения концентрации вирусов в пробах применяют дополнительное концентрирование полиэтиленгликолем. Для этого ПЭГ-6000 добавляют в элюат до конечной концентрации 10% (5 г ПЭГ на 50 мл элюата). Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 18 ч в холодильнике при плюс 4° С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 10 000 об/мин. в течение 1 ч либо при 6 000 об/мин в течение 2 ч. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 1,0 мл отмывочного буфера и исследуют с использованием Комплекта №2.

### 5. Выделение РНК и проведение обратной транскрипции.

Реактивы для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции НЕ ВХОДЯТ в состав настоящего набора и должны приобретаться дополнительно.

Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции осуществляют с использованием соответствующих коммерческих наборов, согласно прилагаемой инструкции.

### 6. Проведение ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени с помощью Комплекта №2.

- Разморозить реактивы, входящие в состав Комплекта №2.
- Отобрать и промаркировать 24 пробирки объемом 0,2 мл с прозрачной плоской крышкой;
- Приготовить 2 ПЦР-смеси:

	ПЦР-смесь для выявления энтеровирусов	ПЦР-смесь для выявления норовирусов
ПЦР-смесь №1	130 мкл	130 мкл
ПЦР-смесь №2 «норо»	-	65 мкл
ПЦР-смесь №2 «энтеро»	65 мкл	-
Таг-полимераза	6,5 мкл	6,5 мкл

- Перемешать подготовленные смеси и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с).
- Внести по 15 мкл каждой из приготовленных смесей в 12 пробирок для проведения ПЦР амплификации в 10 исследуемых и 2 контрольных пробах.
- Внести по 10 мкл кДНК исследуемых образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Каждый из исследуемых образцов вносят в 2 пробирки для параллельной детекции норо- и энтеровирусов.
- Внести по 10 мкл контрольных образцов: ПЦР К<sup>-</sup>, К<sup>+</sup> энтеро, К<sup>+</sup> норо в соответствующим образом промаркированные пробирки.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

### 7. Проведение амплификации с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

- Запрограммировать термоциклер с оптическим модулем следующим образом:

Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
		1	
Преденатурация	95°С	5 минут	1
Денатурация	95°С	15 сек	45
Отжиг <i>Детекция флуоресцентного сигнала</i>	60°С	45 сек	

Элонгация	72 <sup>0</sup> С	15 сек	
-----------	-------------------	--------	--

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется по каналу для флуорофора ROX.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

#### **8. Анализ и интерпретация результатов.**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора ROX. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы кДНК энтеро-, или норовирусов. При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции.

Интерпретируют результаты следующим образом:

- кДНК энтеровирусов обнаружена, если для данной пробы в пробирке, содержащей ПЦР-смесь №2 «энтеро» в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла  $Ct \leq 40$ .
- кДНК норовирусов обнаружена, если для данной пробы в пробирке, содержащей ПЦР-смесь №2 «норо» в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла  $Ct \leq 40$ .

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если для проб ПЦР K<sup>-</sup> получен отрицательный результат в пробирках, содержащих ПЦР-смесь №2 «энтеро» и ПЦР-смесь №2 «норо», а для проб K<sup>+</sup> энтеро и K<sup>+</sup> норо получено пороговое значение  $Ct \leq 40$ .

Если для положительных контролей ПЦР K<sup>+</sup> энтеро и K<sup>+</sup> норо значение порогового цикла отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, для которых отсутствует значение порогового цикла.

Если для отрицательного контроля ПЦР K<sup>-</sup> определено значение порогового цикла  $Ct \leq 40$ , необходимо повторить исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла.