



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕЙКЕМИЯ-КОШЕК-ФАКТОР» для выявления ДНК провируса лейкемии кошек в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

21.10.60-349-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение	4
2. Характеристика набора	4
3. Аналитические характеристики.....	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование	6
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	8
6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение	9
6.2. Подготовка исследуемых проб	9
7. Проведение анализа	9
7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб	10
7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР	11
7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле	12
8. Интерпретация результатов анализа	11
9. Условия транспортирования	12
10. Условия хранения	12
11. Срок годности	12
Приложение 1. Приготовление реакционной смеси	13
Приложение 2. Порядок работы на амплификаторе «Терцик».....	14
Приложение 3. Лист вносимых изменений	17

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК провируса лейкемии кошек (Feline leukemia virus, FLV) в биологическом материале (цельная кровь), методом амплификации ДНК с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома провируса лейкемии кошек и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции.. Детекция продуктов амплификации осуществляется электрофоретически с разделением продуктов амплификации в агарозном геле.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Состав комплекта №1

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР FFLV	прозрачная жидкость зеленого цвета	830	1660	1
2	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	17	33	1
3	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная вязкая бесцветная жидкость	2000	2000	1(2)

Таблица 2. Состав комплекта №2

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО Т1	прозрачная бесцветная жидкость ¹	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)²	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО FFLV	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

¹ Возможна легкая опалесценция

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

В набор не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении НК других микроорганизмов: вируса гриппа А, возбудителя болезни Ауески, вируса диареи КРС, вируса инфекционного ринотрахеита КРС, вируса парагриппа-3 КРС, коронавируса КРС, *Brucella abortus*; *Brucella ovis*; *Brucella canis*; *Pasteurella multocida*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium avium*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter fetus*; *Clostridium perfringens*; *Salmonella dublin*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК кошки, КРС, курицы, свиньи, человека.

4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследование проводится в два этапа в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ

рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК по п 2.2.

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терцик», «ДТ 96» ДНК-технология).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).

- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

Для зоны электрофоретического анализа

- Реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле по 2.2
- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «ДНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат;
- Одноразовые перчатки.

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение

Кровь для исследования отбирают в объеме не менее 0,5-1,0 мл в стерильные пробирки с 3% раствором ЭДТА из расчета 10:1. Желательно использовать одноразовые системы взятия крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Полученные образцы необходимо транспортировать и хранить в следующем режиме:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение недели с момента взятия материала.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2. Подготовка исследуемых проб

Пробы цельной крови с ЭДТА используют для экстракции ДНК без предварительной подготовки.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-ЛЕЙКЕМИЯ-КОШЕК-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение ПЦР;
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза (на этом этапе дополнительно используют набор реагентов для электрофоретического анализа, например набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР»);
- учет результатов анализа.

7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО³** (пробирку обозначить как **ВК-**).

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°С до 8°С или в течение года при температуре не выше минус 16°С.

³ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

7.2. Подготовка образцов к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО FFLV** и **ДНК буфера**.

В отдельной пробирке смешать компоненты набора реагентов из расчета на каждую реакцию⁴:

- 15 мкл **ПЦР СМЕСЬ FFLV**;
- 0,3 мкл **TAQ POLYMERASE**

Перемешать смесь на вортексе (без вспенивания) и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без подогревающейся крышки (например, «Терцик», «ДНК технология») сверху в пробирки внести по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки (под масло или непосредственно на масло) внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (**К-**) 10 мкл **ДНК буфера**;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу **ВК-**);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (**К+**) – 10 мкл **ПКО FFLV**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термоциклирования приведен в Таблицах 3, 4 и 5.

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации («Терцик», ДНК технология, ПЦР в пробирках объемом 0,5 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 2 мин	1
2	95°C – 30 сек	42
	60°C – 30 сек	
	72°C – 40 сек	
3	72°C – 2 мин	1

⁴ Объемы реагентов ПЦР СМЕСЬ FFLV и TAQ POLYMERASE на различное количество образцов приведены в Приложении 1

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле

Внимание: Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

8. Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК.

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 5.

Таблица 6. Оценка результатов анализа.

Проба	Полоса электрофореграмме		Результат
	147 п.н.	500 п.н.	
	<i>FFLV</i>	<i>BKO</i>	
НКО К+	есть	есть	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	нет	нет	Реакция прошла успешно
	есть	нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	нет	есть	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	нет	есть	Экстракция прошла успешно
	есть	есть или нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	нет	нет	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

Проба	Полоса электрофореграмме		Результат
	147 п.н.	500 п.н.	
	<i>FFLV</i>	<i>BKO</i>	
Образцы	есть	есть или нет	Результат анализа положительный . <i>ДНК провируса лейкемии кошек обнаружена</i>
	нет	есть	Результат анализа отрицательный
	нет	нет	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- отсутствует полоса ВКО, а в К+ и исследуемых образцах полоса ВКО присутствует – результаты можно считать достоверными. Также в случае полоса ВКО в К+ отсутствует, а в ВК- и образцах присутствует – результаты можно считать достоверными.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения Ct для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации..

9. Условия транспортирования

Набор «ПЦР-Ф-ЛЕЙКЕМИЯ-КОШЕК-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Хранение комплектов набора «ПЦР-Ф-ЛЕЙКЕМИЯ-КОШЕК-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

11. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕЙКЕМИЯ-КОШЕК-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Приготовление реакционной смеси

Количество реакций	Объем ПЦР FFLV, мкл	объем TAQ POLYMERASE, мкл
3	45	0,9
4	60	1,2
5	75	1,5
6	90	1,8
7	105	2,1
8	120	2,4
9	135	2,7
10	150	3
15	225	4,5
20	300	6
25	375	7,5
30	450	9
35	525	10,5
40	600	12
45	675	13,5
50	750	15
55	825	16,5

Приложение 2. Порядок работы на амплификаторе «Терцик»

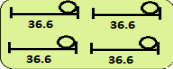
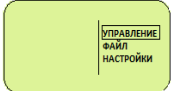
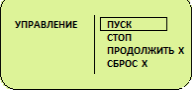
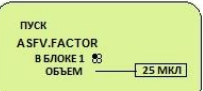
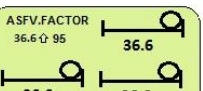
Работа с прибором осуществляется с помощью меню. Первоначально необходимо создать программу FFLV.FACTOR согласно алгоритму, приведенному в Таблице 6. При последующих запусках прибора достаточно выбрать сохраненную программу из памяти прибора (Таблица 7).

Таблица 6. Программирование амплификатора «Терцик»

№	Содержание индикатора	Используемые кнопки	Действие
1			Нажать «ПРИНЯТЬ» для перехода к меню
2			Выбрать «ФАЙЛ»
			Принять
3			Выбрать «Создать»
			Принять
4			Выбрать «Цикл»
			Принять
5			Установить температуру 95 °C
			Принять
6			Установить время 5 минут
			Принять
7			Принять
8			Установить число циклов, равное 1
			Принять
9			Выбрать «Вставить после»
			Принять

№	Содержание индикатора	Используемые кнопки	Действие
10			Выбрать «Цикл»
			Принять
11			Установить в первой строке температуру 95 °С, время 30 сек; во второй – 58 °С, 30 сек; в третьей 72 °С, 30 сек
			Принять
12			Установить число циклов, равное 45
			Принять
13			Нажать «назад»
14			Выбрать «ТОЧНЫЙ»
			Принять
15			Установить объем, равный 50 МКЛ
			Назад
16			Выбрать «ДРУГОЕ ИМЯ»
			Принять
17	В открывшемся окне набрать по буквам название «FFLV.FACTOR» и нажмите на кнопку назад.		
18			Выбрать «FFLV.FACTOR»
			Принять

Таблица 7. Запуск амплификатора «Терцик»

№	Содержание индикатора	Используемые кнопки	Действие
1			Нажать на “ПРИНЯТЬ” для перехода к меню
2			Выбрать “УПРАВЛЕНИЕ”
			Принять
3			Выбрать “ПУСК”
			Принять
4			Выбрать программу FFLV.FACTOR
			Принять
5			Выбрать реакционный блок (например, первый)
			Принять
6			Установить действительный объем смеси
			Принять
7		Программа FFLV.FACTOR начала выполняться в первом блоке	

Приложение 3. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 26.05.2021	стр. 5, стр. 11	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.2 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.3 от 04.05.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕЙКЕМИЯ-КОШЕК-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства, просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru