



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-ВГБК-ФАКТОР»
для выявления РНК возбудителя геморрагической болезни кроликов
(Rabbit hemorrhagic disease virus) в биологическом материале, кормах,
шкурках, пуху и изделиях из меха методом обратной транскрипции и
полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с электрофоретической детекцией
продуктов амплификации в агарозном геле**

21.10.60-374-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические характеристики	6
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы и оборудование	7
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб.....	9
6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение	9
6.2. Подготовка исследуемых проб	9
7. Проведение анализа	10
7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб	10
7.2. Подготовка образцов к проведению ОТ-ПЦР	10
7.3. Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле.....	12
8. Интерпретация результатов анализа	12
9. Условия транспортирования	13
10. Условия хранения.....	13
11. Срок годности.....	13
Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций	14
Приложение 2. Лист вносимых изменений	15

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
ВКО	внутренний контрольный образец
РНК	рибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная ДНК
ОТ-ПЦР реакция	обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор реагентов предназначен для выявления РНК возбудителя геморрагической болезни кроликов (Rabbit hemorrhagic disease virus) в биологическом материале (фекалии), патологическом материале, кормах, рыбной и мясокостной муке, шкурках, пуху и изделиях из меха методом обратной транскрипции и амплификации кДНК с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор реагентов основан на использовании двух последовательных реакций: обратной транскрипции вирусной РНК для получения первой цепи кДНК с одноцепочечной РНК-матрицы и полимеразной цепной реакции для амплификации фрагмента полученной кДНК матрицы. Обе реакции проводятся последовательно в одной ПЦР-пробирке (one-tube), что сокращает и упрощает процедуру анализа, снижает риск контаминации и ошибок при переносе кДНК в другую пробирку для ПЦР. Детекция продуктов ПЦР осуществляется методом электрофореза в агарозном геле.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР (Комплект №1) и 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		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР ФВГБК	прозрачная жидкость зеленого цвета	830	1660	1
2	Смесь ферментов, RT PCR ENZ.	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	60	1
3	Буфер для разведения РНК, РНК 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		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО ФВГБК	прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)¹	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО ФВГБК	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1
4	Положительный контрольный образец, ПКО ФВК	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор реагентов не входят реактивы для выделения НК. Выделение РНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного

¹ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

В набор реагентов 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: вирусов гриппа А, АЧС, возбудителя болезни Ауески, возбудителя парвовирусной и ротавирусной инфекций, бактерий *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК свиньи, КРС, собаки и 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» и с требованиями Приказа №647 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 23.09.2021 г. «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов вирусной геморрагической болезни кроликов».

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 рабочие реагенты и расходные материалы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одной зоны в другую.

Процесс исследования является строго односторонним, работу следует начинать в зоне подготовки материала, продолжать в зоне экстракции нуклеиновых кислот, затем в зоне амплификации. Запрещается возвращать образцы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывать 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 РНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- 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 и без (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 РНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ОТ-ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терцик», 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 0,5 и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,5 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

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

Для исследования используют следующий материал:

- Фекалии весом 5 г отбирают в стерильный пластиковый контейнер.
- Фрагменты тканей и органов (селезенка, печень) отбирают в стерильный контейнер.
- Корма, рыбная и мясокостная мука

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8°C – в течение суток;
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2. Подготовка исследуемых проб

Из фекалий (1-5 г) готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Взвесь фекалий декантируют в течении 5-10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5 мин. Экстракцию РНК из осветленного экстракта фекалий проводят по возможности, сразу. При необходимости хранения экстракт замораживают.

Исследуемые пробы тканей, органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов. Затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 600-1200 g (2000 об./мин) в течение 5-10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции РНК.

Исследуемые пробы кормов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов. При использовании набора реагентов, не предназначенного для выделения НК из кормов (напр., «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»), допускается экстракция из 100 мкл 10% суспензии образца – в таком случае перед экстракцией суспензию необходимо центрифугировать при 2000 об./мин 5-10 мин.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Анализ с помощью набора реагентов «ПЦР-Ф-ВГБК-ФАКТОР» методом ОТ-ПЦР состоит из трех этапов:

- экстракция НК на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение реакции ОТ-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, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО ФВГБК**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО²** (**пробирку обозначить как ВК-**).

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

Выделенную РНК можно хранить до 3 часов при температуре от 2°C до 8°C или в течение месяца при температуре не выше минус 70°C.

7.2. Подготовка образцов к проведению ОТ-ПЦР

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл, объем НК-пробы - 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ФВГБК, ВКО ФВГБК** и **ДНК Буфера**.

Примечание. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше 40°C (с использованием термостата). **Прогревание пробирки RT PCR ENZ категорически запрещено.**

В отдельной пробирке смешать следующие компоненты набора из расчета на каждую реакцию:

15 мкл **ПЦР ФВГБК**

0,5 мкл **RT PCR ENZ**.

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

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

Расчет объемов реагентов на различное количество реакций указан в Приложении 1.

Отобрать необходимое количество пробирок исследуемых и контрольных проб для проведения ОТ-ПЦР. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без нагрева крышек пробирок («Терцик», ДНК технология) сверху добавить 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 НК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу **ВК-**);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (**К+**) – 10 мкл **ПКО ФВГБК**.
- г) в пробирку положительный контроль ПЦР (**К+**) – 10 мкл **ПКО ФВК**.

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 Таблице 3.

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации (Терцик, ДНК технология).

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	48°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 30 сек	40
	54°C – 30 сек	
	72 °C– 30 сек	
4	72 °C– 5 мин	1
5	10°C	Хранение

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 НК методом гель-электрофореза.

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 НК в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Оценка результатов анализа.

Проба	Полоса на электрофореграмме		Результат
	500 п.н.	634 п.н.	
	ВГБК	ВКО	
ПКО ФВГБК	есть	есть или нет	Реакция положительного контроля прошла успешно
ПКО ФВК	есть или нет	есть	Реакция внутреннего контроля прошла успешно
РНК 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 на электрофореграмме		Результат
	500 п.н.	634 п.н.	
	ВГБК	ВКО	
Образцы	есть	есть или нет	Результат анализа положительный . <i>РНК вируса гемморагической болезни кроликов 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-ВГБК-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-ВГБК-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

11. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ПЦР-Ф-ВГБК-ФАКТОР» 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций

Количество реакций	Объем ПЦР ФВГБК, мкл	Объем RT PCR ENZ, мкл
5	75	2,5
10	150	5,0
15	225	7,5
19	285	9,5
23	345	11,5
27	405	13,5
31	465	15,5
35	525	17,5
39	585	19,5
43	645	21,5
47	705	23,5
51	765	25,5
55	825	27,5
59	885	29,5
63	945	31,5
67	1005	33,5
71	1065	35,5
75	1125	37,5
79	1185	39,5
83	1245	41,5
87	1305	43,5
91	1365	45,5

Приложение2. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 26.05.2021	стр. 5, стр. 10	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.2 от 24.02.2022	п. 6.2. Подготовка исследуемых проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке биоматериала
Версия 1.3 от 29.04.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-Ф-ВГБК-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