



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-КЧС-ФАКТОР»
для выявления РНК вируса классической чумы свиней
(Classical swine fever virus) в биологическом материале и
продуктах свиного происхождения методом обратной
транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с
электрофоретической детекцией продуктов амплификации в
агарозном геле**

21.10.60-159-51062356-2018

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 | 8 |
| 6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение | 8 |
| 6.2. Подготовка исследуемых проб | 9 |
| 7. Проведение анализа | 10 |
| 7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб | 10 |
| 7.2. Подготовка и проведение 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 вируса классической чумы свиней (КЧС) в биологическом материале (мазки из носа и миндалин, фекалии, паренхиматозные органы, кровь), паталогическом материале и продуктах свиного происхождения методом обратной транскрипции и амплификации кРНК 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 ФКЧС | 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 ФКЧС | прозрачная бесцветная жидкость | 550 | 1100 | 1 |
| 2 | Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер) | прозрачная бесцветная жидкость | 1500 | 2000 | 1 |
| 3 | Положительный контрольный образец, ПКО ФКЧС | прозрачная бесцветная жидкость ¹ | 100 | 200 | 1 |

В набор реагентов не входят реактивы для выделения НК. Выделение РНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки,

¹ Возможна легкая опалесценция

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 СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

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 однонаправленным, 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);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО РНК-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», РНК-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, «РНК-технология»);
- Ультрафиолетовый транслюминатор 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:

- Цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. Для получения сыворотки забирают кровь в пробирку без антикоагулянта;

- Мазки со слизистой носоглотки и миндалин снимают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора;

- Фрагменты тканей и органов (легкие, миндалины, селезенка, трахея, воздухоносные мешки, кишечник) отбирают в стерильный контейнер.

- Лимфоузлы берут на исследование целиком.

- Фекалии весом 5 г отбирают в стерильный пластиковый контейнер.

- Продукты свиного происхождения (куски свинины, фарш, мясные полуфабрикаты) отбирают в стерильные контейнеры.

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.

6.2. Подготовка исследуемых проб

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, мазки со слизистой носоглотки и миндалин, культуры клеток используют для выделения РНК без предварительной подготовки.

Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 °C до 8 °C более 1 ч после ее взятия, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Переносят плазму в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Для получения сыворотки пробирки с кровью (без антикоагулянта) отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 600–1600 g (3000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

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 и продуктов свиного происхождения (небольшие кусочки до 1 г весом) 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 600-1600 g (3000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 2 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции РНК.

7. Проведение анализа

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

- экстракция НК на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «РНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение реакции ОТ-ПЦР
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза (на этом этапе дополнительно используют набор реагентов для электрофоретического анализа, например набор «ПЦР-ЭФ-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 ФКЧС**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО (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 и проведение ОТ-ПЦР

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

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ФКЧС, ВКО ФКЧС 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 ФКЧС**
- 0,5 мкл **RT PCR ENZ.**

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 ФКЧС**.

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, РНК технология).

| № п/п | Температурно-временной режим | Число циклов |
|-------|------------------------------|--------------|
| 1 | 50°C – 25 мин | 1 |
| 2 | 95°C – 5 мин | 1 |
| 3 | 95°C – 15 сек | 45 |
| | 60°C – 20 сек | |
| | 72 °C – 20 сек | |
| 4 | 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 контрольных образцов.

| Контрольные образцы | Этап анализа | Специфическая полоса на электрофореграмме | |
|---------------------|---------------|---|---------------------------|
| | | 400 пар нуклеотидов (КЧС) | 600 пар нуклеотидов (ВКО) |
| ВК- | Экстракция НК | нет | да |
| К+ | ОТ-ПЦР | да | да |
| К- | ОТ-ПЦР | нет | нет |

Появление специфической полосы ПЦР продукта 400 пн для отрицательного контроля этапа экстракции ВК- и полос 400 пн и/или 600 пн для отрицательного контроля этапа ПЦР К- свидетельствует о наличии

контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

На дорожках с исследуемыми образцами должно наблюдаться одна или две полосы, совпадающими по подвижности с полосами образца К+ (ПКО ФКЧС).

Образец считается **отрицательным (РНК КЧС отсутствует)** если не наблюдается нижняя специфическая полоса на уровне 400 пар нуклеотидов и при этом наблюдается специфическая верхняя полоса ВКО на уровне 600 пар нуклеотидов.

Образец считается **положительным (РНК КЧС присутствует)** если наблюдается полоса, подвижность которой совпадает с подвижностью нижней полосы (400 пар нуклеотидов) на дорожке К+ (ПКО ФКЧС). Наличие полосы ВКО (600 пар нуклеотидов) при этом не обязательно.

Исследуемые образцы, для которых на дорожках отсутствуют обе полосы, требуют повторного проведения исследования. Отсутствие полосы ВКО (600 пар нуклеотидов) при отсутствии амплификации целевого ПЦР продукта КЧС (400 пар нуклеотидов) указывает на наличие ингибиторов в пробе (ах) или на ошибки при постановке реакции. Необходимо провести исследование начиная с этапа экстракции НК.

9. Условия транспортирования

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

10. Условия хранения

Хранение комплектов наборов «ПЦР-Ф-КЧС-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

11. Срок годности

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

Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций

| Количество реакций | Объем ПЦР ФКЧС, 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 |

Приложение 2. Лист вносимых изменений

| Редакция | Место вносимых изменений | Суть вносимых изменений |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Версия 1.1 от 24.03.2020 | Подготовка и проведение ОТ-ПЦР | Увеличена температура отжига |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |