




Набор реагентов для выявления РНК вируса классической чумы свиней (КЧС)
методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)
в режиме «реального времени»

АмплиПрайм® КЧС

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2019-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода.....	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	6
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ.....	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Взятие исследуемого материала.....	8
6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК	8
6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов.....	8
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	10
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала.....	10
7.2. Подготовка материала к исследованию	11
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала.....	12
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР.....	12
8.3. Внесение проб РНК, проведение амплификации и детекции.....	13
8.4. Анализ и обработка результатов.....	14
8.5. Используемые настройки амплификаторов.....	14
8.6. Интерпретация результатов.....	15
8.7. Возможные ошибки.....	16
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
9.1. Предел обнаружения	17
9.2. Аналитическая специфичность.....	17
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	18
10.1.Срок годности.....	18
10.2.Транспортирование	18
10.3.Хранение.....	18
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
РНК	рибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
РНКаза	рибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
ОКО	отрицательный контрольный образец, отрицательный контроль экстракции
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПК	положительный контроль
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления РНК вируса классической чумы свиней (КЧС) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® КЧС».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® КЧС», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® КЧС» (далее по тексту - набор) предназначен для выявления РНК вируса классической чумы свиней (*Classical swine fever virus*) в биологическом материале (пробы цельной крови, плазмы, сыворотки крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин от латентно инфицированных и больных животных; патологический материал от павших животных: селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг), фекалиях, продуктах свиноводства (мясо, шкуры и т.п.), продуктах питания и полуфабрикатах животного происхождения (фарш, сосиски, колбасы и т.п.), а также в инфицированных культурах клеток методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов используется в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования.

Материалом для проведения ОТ-ПЦР служат пробы РНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в инструкции по применению набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации специфических участков полученной кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции РНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь КЧС	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,70	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,055	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
ПКО КЧС	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,30	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Краткое руководство	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Вкладыш	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹ и проведении одновременной амплификации участка кДНК, синтезированной на матрице геномной РНК вируса КЧС, и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО В при помощи специфических к этим участкам праймеров и ферментов MMLV-ревертазы и Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе ОТ-ПЦР в одной пробирке одновременно амплифицируются участок кДНК вируса КЧС и последовательность ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ²
Мишень	кДНК вируса КЧС	ВКО В
Область амплификации	5' - нетранслируемая область	искусственно синтезированная последовательность

¹ ВКО В входит в состав наборов реагентов, рекомендованных Производителем для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала.

² Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® КЧС» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для ветеринарных и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® КЧС» возможно ОТ-ПЦР-исследование только проб РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО В», входящим в состав набора для проведения экстракции НК. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

4.6. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований 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» (утверждены приказом руководителя Роспотребнадзора 22 декабря 2009 г.) и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмыwania в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ОТ-ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Вакуумные пробирки для забора крови с ЭДТА.

6.1.2. Вакуумные пробирки для забора крови без антикоагулянта.

6.1.3. Двухсторонние иглы для забора крови в вакуумные пробирки.

6.1.4. Металлические инструменты (скальпели, ножницы и т.п.).

6.1.5. Анатомический пинцет.

6.1.6. Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек ротовой и носовой полостей или сухие стерильные зонды с ватными тампонами.

6.1.7. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант или стерильный физиологический раствор.

6.1.8. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл.

6.1.9. Пакеты и емкости для отбора, транспортирования и хранения полуфабрикатов, продуктов питания, однократного применения (Zip-Lock пакеты).

6.1.10. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2.2. Фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.3. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор, или стерильный изотонический раствор натрия хлорида.

6.2.4. Глицерин 10–15 % (при необходимости длительного хранения фекалий).

6.2.5. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.

6.2.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.8. Вортекс

6.2.9. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.10. Ножницы.

6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции РНК/ДНК «МагноПрайм ВЕТ» («Формат 96») или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор Производителя, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала (пробы цельной крови, плазмы, сыворотки крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин от латентно инфицированных и больных животных; патологический материал от павших животных: селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг), фекалиях, продуктах свиноводства (мясо, шкуры и т.п.), продуктах питания и полуфабрикатах животного происхождения (фарш, сосиски, колбасы и т.п.), а также из инфицированных культур клеток для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной РНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции НК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм ВЕТ» формы выпуска «Формат Контроли». Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2.Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции РНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции РНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1.Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов:

- плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,6 мл или 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2.Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3.Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5.Центрифуга-вортекс.

6.4.6.Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7.Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM и R6G с характеристиками, указанными в таблице 4;

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- скорость нагрева не менее 2°C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1°C/сек.

6.4.8. Холодильник с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С.

6.4.9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.10. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- пробы цельной крови, плазмы, сыворотки крови;
- мазки со слизистой носоглотки и миндалин от латентно инфицированных и больных животных;
- патологический материал от павших животных: селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг);
- фекалии;
- продукты свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и мясные изделия (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.);
- инфицированные культуры клеток.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для пищевых продуктов. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах.

Для получения **сыворотки** кровь отбирают в пробирку без антикоагулянта, для получения **плазмы** – в пробирку с антикоагулянтом. Забор крови проводят из яремной вены, нижней полой вены или ушной вены. Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Мазки со слизистой носоглотки и миндалин получают с помощью стерильного зонда, который вместе с материалом помещают в пробирку с транспортной средой.

Пробы органов/тканей массой не более 1 г отбирают в одноразовую пластиковую посуду или пластиковые пакеты, лимфоузлы берут целиком.

Трубчатые кости посылают на исследование целыми, с неповрежденными эпифизами.

Используют **пробы фекалий** массой примерно 1 – 3 г (1 – 3 мл). Переносят пробу в количестве 1 г (1 мл) отдельным наконечником с фильтром или одноразовым шпателем в стерильный контейнер.

Образцы цельной крови хранят при температуре от 2 до 8°C в течение 7 суток. Не допускается замораживание образцов цельной крови.

Образцы исследуемого материала (за исключением цельной крови) хранят при следующих условиях:

- при температуре 2 – 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Несоблюдение требований может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Кровь, культуры клеток и мазки со слизистой носоглотки и миндалин используются без предварительной подготовки.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10 мин при 1000 g. После этого переносят плазму в количестве 0,8 – 1,0 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл.

Сыворотку крови получают отстаиванием пробирки с цельной кровью при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800 – 1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.

Пробы тканей, органов, продуктов свиного происхождения и продуктов питания гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатно-солевом буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции РНК.

При исследовании нативных **фекалий** без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий приготовление суспензии не требуется). В пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовой лопаткой) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к приготовленной суспензии фекалий добавить глицерин в конечной концентрации 10–15 %. После тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30 – 40 мин пробы заморозить.

Условия хранения предварительно обработанных проб фекалий:

- – при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- – при температуре минус 68 °С – длительно.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75%.

8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала

Для экстракции РНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции РНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции НК.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁴ в одном повторе.

ВНИМАНИЕ! При проведении экстракции РНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В)⁴.

В процессе экстракции РНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем **исследуемого образца**⁵ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем **реагента ВКО В** – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем **реагента ОКО** – **100 мкл** в пробирку для **ОКО**;
- объем **реагента**, используемого **для элюции РНК**, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ») или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм ВЕТ» или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ОТ-ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси КЧС**, **Ревертазы R** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

³ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁴ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁵ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь КЧС	10,0*(N+1)	N – количество образцов РНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	5,0*(N+1)	
Реввертаза R	0,5*(N+1)	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью КЧС, Реввертазой R и Буфером В, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб РНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб РНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по 10 мкл проб РНК.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ПКО КЧС.

б) **отрицательный контроль экстракции** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл реагента К-.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G ⁶	

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание – рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых (см. п. 8.5.) зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁷
Продукт амплификации	кДНК вируса КЧС	ВКО В

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Рекомендуемые настройки для приборов указаны в таблицах 8 - 10.

Таблица 8

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

Канал	Оптимизация уровня сигнала	Порог	Устранение выбросов	Корректировка уклона	Динамический фон	Исключить циклы
FAM/Green	от 5 FI до 10 FI	0,03	15 %	включена	включен	-
R6G/Yellow	от 5 FI до 10 FI	0,05	15 %	включена	включен	-

⁷ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

При запуске прибора роторного типа в окне «Автооптимизация уровня сигнала» активировать функцию «Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции».

Таблица 9

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

Канал	Threshold / Порог	Исключить циклы
FAM	10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО КЧС в последнем цикле амплификации.	-
HEX	10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОКО в последнем цикле амплификации.	-

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 10.

Таблица 10

Настройки для прибора «CFX96»

Параметр	Шаг этапа циклирования	Скорость нагревания/охлаждения
Step Options	95 °C	2,5 °C/sec
	60 °C	2,5 °C/sec

8.6. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 12. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлен в таблицах 11 и 12 соответственно.

Таблица 11

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Определено $Ct \leq 30,5 / \leq 34,5$
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует
ПКО КЧС (положительный контроль)	Определено $Ct \leq 32,5 / \leq 35,5$	Отсутствует

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции	РНК вируса КЧС обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофоров FAM отсутствует, при этом значение Ct по каналу R6G определено $\leq 30,5$ / $\leq 34,5$	РНК вируса КЧС не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофоров FAM отсутствует, при этом значение Ct по каналу R6G определено $> 30,5$ / $> 34,5$ или отсутствует	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции РНК.

8.7.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ОТ-ПЦР.

8.7.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (Ct), при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести ОТ-ПЦР и детекцию для этого образца.

8.7.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и R6G, что является невалидным результатом и свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® КЧС» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл. Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты РНК вируса КЧС.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК вирусов и микроорганизмов (см. таблицу 13). НК вирусов и микроорганизмов в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл, а также образцы НК, выделенные из проб крови, смывов с носовой и ротовой полостей, от клинически здоровых свиней, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемый с помощью набора вирус гриппа А.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Вирус африканской чумы свиней	<i>Escherichia coli</i>
Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней	<i>Haemophilus parasuis</i>
Вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Вирус эпидемической диареи свиней	<i>Lawsonia intracellularis</i>
Цирковироз свиней 2-го типа	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>Chlamydia suis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Mycoplasma hyopneumonia</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>
<i>Brucella suis</i>	<i>Pasterella multocida</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Salmonella Choleraesuis</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Salmonella Dublin</i>
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Chlamydophila pecorum</i>	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Допускается транспортирование не более 5 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от -24 до -16 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси КЧС, Реввертазы R и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® КЧС» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Код партии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению