




Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса
геморрагической болезни кроликов (ВГБК) и ВГБК 2 типа методом ОТ-ПЦР
в режиме «реального времени»

«АмплиПрайм® ВГБК / ВГБК-2»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2069-1Z  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. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	7
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	9
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	12
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция РНК из исследуемого материала	12
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР	13
8.3. Внесение проб РНК, проведение амплификации и детекции	13
8.4. Анализ и обработка результатов	14
8.5. Используемые настройки амплификаторов	15
8.6. Интерпретация результатов	16
8.7. Возможные ошибки	17
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	18
9.1. Предел обнаружения	18
9.2. Аналитическая специфичность	18
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	19
10.1. Срок годности	19
10.2. Транспортирование	19
10.3. Хранение	19
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВГБК	вирус геморрагической болезни кроликов
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная ДНК
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
РНКаза	рибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
ОКО	отрицательный контрольный образец
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 и дифференциации РНК вируса геморрагической болезни кроликов (ВГБК) и ВГБК 2 типа методом ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВГБК/ВГБК-2».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® ВГБК/ВГБК-2», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® ВГБК/ВГБК-2» предназначен для выявления и дифференциации РНК вируса геморрагической болезни кроликов (ВГБК) (Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV, RHDVa, G I.1)) и ВГБК 2 типа (RHDV2; G I.2.) в биологическом материале от кроликов и зайцев (пробы цельной крови, органов (печень, селезенка, сердце, легкие), мочи, мазки со слизистой оболочки носовой полости) методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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 разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

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

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации 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 используется для ручной методики выделения НК или совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь ВГБК	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 ВГБК	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 по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	1
Вкладыш к набору для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Тестирование состоит из нескольких этапов. На первом этапе осуществляется экстракция РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹. На втором этапе проводится одновременная амплификация кДНК, синтезированной на матрицах геномной РНК ВГБК, ВГБК 2 типа, и кДНК, синтезированной на матрице РНК внутреннего контрольного образца ВКО В (искусственно синтезированная последовательность), при помощи специфичных к этому участку 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 ДНК-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 одновременно в одной пробирке проходит амплификация кДНК, синтезированной на матрицах геномной РНК ВГБК, ВГБК 2 типа и последовательности ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 3-м различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

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

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	R6G ²	ROX	Cy5
кДНК-мишень	кДНК, синтезированная на матрице РНК ВГБК	кДНК, синтезированная на матрице РНК ВГБК-2	ВКО В
Область амплификации	VP60	VP60	искусственно синтезированная последовательность

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® ВГБК/ВГБК-2» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

4.3. Непригодными для исследования являются образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта и образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

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

4.5. С помощью набора «АмплиПрайм® ВГБК/ВГБК-2» 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.

4.6. 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, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

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

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» 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 отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сушильном 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 или цитратом натрия.
- 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-тампон для взятия биологического материала со слизистой оболочки носовой полости 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, стерильный.
- 6.1.9. Пластиковый пакет с застежкой Zip-lock.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

- 6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки 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.
- 6.2.4. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.2.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 мл.

6.2.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.7. Ножницы, скальпели.

6.2.8. Пинцет.

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, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала (пробы цельной крови, органов (печень, селезенка, сердце, легкие), мочи, мазки со слизистой оболочки носовой полости) 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 РНК 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:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 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 до 100 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. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

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

- наличие трех и более независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров R6G, ROX и Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690

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

6.4.9. Холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температурный режим от минус 24 °С до минус 16 °С.

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

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- пробы цельной крови, мазки со слизистой оболочки носовой полости, моча от латентно инфицированных и больных кроликов и зайцев;
- патологический материал от павших или вынужденно убитых кроликов и зайцев (печень, селезенка, сердце, легкие).

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

При отборе и транспортировке проб необходимо руководствоваться требованиями правил «Ветеринарные правила 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» (утверждены приказом Минсельхоза РФ от 12 декабря 2017 г. № 624).

Взятие **венозной крови** проводится из краевой вены уха в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия). Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения ОТ-ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 2 суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Взятие материала со **слизистой оболочки носовой полости** проводится из полости носа с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается хранение образцов мазков до проведения ОТ-ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мочу получают во время мочеиспускания, надавливанием на мочевой пузырь, путем катетеризации, а также с помощью пункции мочевого пузыря (уроцистоцентез). Мочу после сбора отстаивают в течение 1 часа, затем осторожно сливают, оставляя придонную часть с осадком – около 10 мл.

Допускается хранение образцов мочи до проведения ОТ-ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

При осуществлении сбора мочи в емкость с транспортной средой или реагентами для консервации и стабилизации, хранение образцов мочи до проведения предобработки проводить согласно инструкции к используемой емкости для сбора.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Пробы органов (печень, селезенка, сердце, легкие) размером 1x1x1 см массой не более 1 г отбирают в одноразовую пластиковую посуду или пластиковые пакеты.

Допускается хранение проб органов до проведения предобработки:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

Несоблюдение требований может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Кровь, мазки со слизистой оболочки носовой полости, моча используются без предварительной подготовки.

Пробы органов гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию, используя стерильный физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции РНК.

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.

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

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».

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 ВГБК, 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.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

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

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью ВГБК, Ревертазой 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 ВГБК**.

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	R6G ⁶ , ROX, Cy5	

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

Примечание: необходимо 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. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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 3-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	R6G ⁶	ROX	Cy5
Продукт амплификации	кДНК вируса ВГБК	кДНК вируса ВГБК-2	ВКО В

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

8.5. Используемые настройки амплификаторов

Рекомендуемые настройки для приборов указаны в таблицах 8 – 10.

Таблица 8

Рекомендуемые настройки для приборов роторного типа

Канал	Опт. уровня сигнала	Порог	Устранение выбросов	Коррект. уклона	Динамический фон	Исключить циклы
R6G ⁷ /Yellow	от 5 FI до 10 FI	0,03	≤ 15 %	включена	включен	от 1 до 5
ROX/Orange	от 5 FI до 10 FI	0,03	≤ 15 %	включена	включен	от 1 до 5
Cy5/Red	от 5 FI до 10 FI	0,03	≤ 15 %	включена	включен	от 1 до 5

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

При использовании амплификатора «CFX96» следует применять настройки согласно таблице 9.

Таблица 9

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

Анализ результатов для прибора «CFX96».

Провести анализ результатов по каналам **R6G**, **ROX** и **Cy5** (для каждого канала по отдельности), активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

Для настройки базовой линии выберите меню **Settings** (Настройки), затем последовательно нажмите кнопки **Base Line Subtracted Curve Fit** (Подбор кривой по точкам с вычетом базовой линии) и **Apply Fluorescence Drift Correction** (Применить коррекцию смещения флуоресценции). В меню **Threshold Cycle Calculation** (Пороговый уровень базовой линии) выбрать режим ручной установки пороговой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** (Циклы базовой линии) выбрать **Auto Calculated** (Рассчитан автоматически), а в подменю **Single Threshold** (Единый пороговый уровень) выбрать **User Defined** (Определен пользователем) и применить настройки, указанные в таблице 10.

Таблица 10

Рекомендуемые настройки для приборов планшетного типа

Канал	Threshold / Порог	Исключить циклы
R6G	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 - 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для ПКО ВГБК в последнем цикле амплификации.	от 1 до 5
ROX		от 1 до 5
Cy5	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10 – 20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОКО в последнем цикле амплификации.	от 1 до 5

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

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, представлены 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		
	R6G ⁸	ROX	Cy5
ПКО ВГБК (положительный контроль)	Определено Ct ≤ 27,0 / ≤ 31,0	Определено Ct ≤ 28,0 / ≤ 32,0	Отсутствует
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Отсутствует	Определено Ct ≤ 28,0 / ≤ 32,0
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 12

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено ≤ 40,0 / ≤ 40,0.	РНК ВГБК и/или ВГБК-2 не обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX определены. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	РНК ВГБК и/или ВГБК-2 обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и ROX отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено > 40,0 / > 40,0 или отсутствует.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

⁸ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

8.7. Возможные ошибки

8.7.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX определены значения 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 R6G и/или ROX и/или Cy5 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.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения⁹

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ВГБК/ВГБК-2» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ВГБК и ВГБК 2 типа (см. таблицу 13). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 13

Предел обнаружения набора

Вирус	Предел обнаружения, копий/мл
ВГБК	$1,0 \times 10^3$
ВГБК-2	$1,0 \times 10^3$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты РНК ВГБК и РНК ВГБК 2 типа.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК вирусов и микроорганизмов (см. таблицу 14). НК вирусов и микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора ВГБК и ВГБК 2 типа.

Таблица 14

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Pasterella multocida</i>	<i>Salm. Cholerae suis</i>
<i>Salm. Typhimurium</i>	<i>Salm. Enteridis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Myxomatosis cuniculorum</i>
European brown syndrome virus	-

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

⁹ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация кДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

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 ВГБК, Ревертазы 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® ВГБК/ВГБК-2» 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