




Набор реагентов для выявления РНК коронавируса кошек и собак
(*Feline coronavirus*, *Canine coronavirus*) методом полимеразной цепной реакции
с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® Коронавирус МДЖ»

АмплиПрайм® Коронавирус МДЖ

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2171-1Z  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..... | 6 |
| 6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ..... | 8 |
| 6.1. Взятие исследуемого материала..... | 8 |
| 6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала..... | 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..... | 11 |
| 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. Интерпретация результатов..... | 15 |
| 8.6. Возможные ошибки..... | 16 |
| 9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА..... | 16 |
| 9.1. Предел обнаружения..... | 16 |
| 9.2. Аналитическая специфичность..... | 17 |
| 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА..... | 17 |
| 10.1. Срок годности..... | 17 |
| 10.2. Транспортирование..... | 17 |
| 10.3. Хранение..... | 17 |
| 11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ..... | 18 |
| 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ..... | 19 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|--------|--|
| Ct | Cycle threshold (пороговый цикл) |
| ВКО | внутренний контрольный образец |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| кДНК | комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ДНКаза | дезоксирибонуклеаза |
| МДЖ | мелкие домашние животные |
| РНК | рибонуклеиновая кислота |
| РНКаза | рибонуклеаза |
| дНТФ | дезоксирибонуклеозидтрифосфаты |
| ОК | отрицательный контроль |
| ОКО | отрицательный контрольный образец |
| К- | отрицательный контроль ПЦР |
| ПК | положительный контроль |
| ПКО | положительный контрольный образец |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| ОТ-ПЦР | полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией |
| УДГ | урацил-ДНК-гликозилаза |

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления РНК коронавируса кошек и собак (*Feline coronavirus, Canine coronavirus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Коронавирус МДЖ».

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Коронавирус МДЖ» (далее по тексту - набор) предназначен для выявления РНК коронавируса кошек и собак (*Feline coronavirus, Canine coronavirus*) в биологическом материале от животных (плазма крови, асцитическая жидкость, фекалии, ректальный мазок) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

Материалом для проведения 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 таблице 1 и 2 соответственно.

Набор предназначен для проведения реакции обратной транскрипции и амплификации полученной кДНК методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции РНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Набор имеет единую форму выпуска для раскапки в любые типы пробирок. Предназначен для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Может быть использован совместно с автоматическими станциями для приготовления и раскапки реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

| Реагент | Объем, мл | Количество | Описание |
|-------------------|-----------|------------|--|
| ПЦР-смесь Cor F/C | 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 Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость. |
| Ревертаза R | 0,055 | 1 пробирка | Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость |
| ПКО Cor F/C | 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 | - |
| Краткое руководство по применению набора | в бумажном виде | 1 |
| Паспорт качества на набор | в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru | - |
| 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 матрице геномной РНК коронавируса кошек и собак, 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 термоллабилен 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 матрице геномной РНК коронавируса кошек и собак и кДНК, синтезированной на матрице РНК внутреннего контрольного образца ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

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

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | R6G ² | Cy5 |
|----------------------|---|---|
| ДНК-мишень | кДНК, синтезированная на матрице РНК коронавируса кошек и собак | ВКО В |
| Область амплификации | ORF 3с | Искусственно синтезированная последовательность |

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

4. ОГРАНИЧЕНИЕ 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 материалов 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® Коронавирус МДЖ» возможно ПЦР-исследование только проб РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом экстракции – «ВКО В», входящим в состав набора реагентов для проведения экстракции НК. Без использования ВКО В невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным 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» 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).

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

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 ОТ-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 сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ОТ-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. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл.

6.1.2. Вакуумные пробирки для забора крови с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия).

6.1.3. Двухсторонние иглы для забора крови в вакуумные пробирки.

6.1.4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50 – 60 мл, стерильный.

6.1.5. Шпатель одноразовый для взятия биологического материала.

6.1.6. Зонд для взятия биологического материала со слизистых оболочек.

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

6.1.8. Стерильный одноразовый шприц.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Фосфатно-солевой буфер или стерильный физиологический раствор (стерильный изотонический раствор хлорида натрия).

6.2.2. Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл или 2 мл.

6.2.3. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

6.2.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.6. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5 или 15, или 50 мл.

6.2.7. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» с ускорением не менее 2 000 g.

6.2.8. Центрифуга-вортекс.

6.2.9. Раствор глицерина 10 – 15%.

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

6.2.11. Аналитические или прецизионные весы.

6.3. Экстракция РНК из исследуемых образцов

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

- набор позволяет выделять РНК из биологического материала (плазма крови, асцитическая жидкость, фекалии, ректальный мазок) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

- 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 ДНК/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 ДНК/РНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК/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 двух и более независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров R6G 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 |
| 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 служит:

- фекалии;
- ректальный мазок;
- плазма крови;
- асцитическая жидкость.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Пробы фекалий массой примерно 1–3 г отбирают отдельным шпателем в пластиковые контейнеры для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50 – 60 мл.

Условия хранения и перевозки образцов:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.

Взятие материала **со слизистой прямой кишки** проводят путем введения зонда в задний проход на глубину 4 – 5 см, аккуратно вращая зонд вокруг оси, собирают материал на зонд, осторожно извлекают зонд. Переносят зонд в пробирку с транспортной средой.

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

ВНИМАНИЕ! Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Взятие венозной крови проводится после длительного голодания (не менее 6 часов) 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 ПЦР-исследования:

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

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Асцитическая жидкость, полученная при пункции брюшной полости одноразовым шприцом, отбирается в стерильный контейнер объемом 60 мл. При этом центрифугирование не требуется. Для исследования отбирают жидкость без сгустков.

Допускается хранение образцов жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Подготовка материала к исследованию

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 фосфатно-солевого буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовым шпателем) внести 0,1 г 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:

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

Для получения **плазмы крови** пробирки с цельной кровью центрифугируют 20 минут при 800 – 1600g (3000 об./мин) при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Образцы **асцитической жидкости** и **ректальных мазков** используются без предварительной подготовки.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

- температура окружающего воздуха от 20 °С 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).

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

- объем исследуемого образца⁵ – **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 ДНК/РНК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ») или **100 мкл** (при использовании набора для экстракции «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 Cor F/C**, **Буфера В** и **Реввертазы R**, 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 Cor F/C | $10,0 \cdot (N+1)$ | N – количество образцов РНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли. |
| Буфер В | $5,0 \cdot (N+1)$ | |
| Реввертаза R | $0,25 \cdot (N+1)$ | |

8.2.2. Разморозить содержимое пробирок. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Cor F/C** и **Буфером В** на вортексе. Осадить капли со стенок пробирок с **ПЦР-смесью Cor F/C**, **Буфером В** и **Реввертазой R** кратким центрифугированием 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, полученных на этапе экстракции. 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**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) положительный контроль ПЦР (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ПКО Cor F/C**.

б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – 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, 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, инструкции по применению набора и краткому руководству, прилагаемому 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 ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 4-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Детекция флуоресцентного сигнала

| Канал для флуорофора | R6G ⁶ | Cy5 |
|----------------------|---|---------|
| Продукт амплификации | кДНК, синтезированная на матрице РНК коронавируса кошек и собак | ДНК ВКО |

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров Hex, Joe, Yellow.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 9 и кратким руководством, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 8 и в кратком руководстве, прилагаемом к набору;

– 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 8 и 9 соответственно, и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Таблица 8

Критерии валидности для контрольных образцов

| Контроль | Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора | |
|---|--|---|
| | R6G | Cy5 |
| ПКО Cor F/C (положительный контроль) | Определено значение Ct не выше граничного ⁷ | Отсутствует |
| ОКО (отрицательный контрольный образец) | Отсутствует | Определено значение Ct не выше граничного |
| К- (отрицательный контроль ПЦР) | Отсутствует | Отсутствует |

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

| Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов) | Интерпретация |
|---|--|
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено не выше граничного. | РНК коронавируса кошек и собак не обнаружена |
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено или отсутствует. | РНК коронавируса кошек и собак обнаружена |
| Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено выше граничного или отсутствует. | Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ |

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, 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.

8.6.2. Причинами получения невалидного результата ОТ-ПЦР могут быть ошибки при экстракции нуклеиновых кислот или наличие ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор и исследование биологического материала.

8.6.3. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация 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.

8.6.4. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров R6G и/или Cy5 определены значения пороговых циклов (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 ПЦР.

8.6.5. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров R6G и Cy5, что 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 обнаружения⁸

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

Таблица 10

Предел обнаружения набора

| Вирус | Предел обнаружения, копий/мл |
|--|------------------------------|
| <i>Feline coronavirus / Canine coronavirus</i> | $1,0 \times 10^3$ |

⁸ Предел обнаружения – 95 %-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК/РНК выявляемых возбудителей, при которой 95 % тестов дают положительный результат).

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты РНК коронавируса кошек и собак.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 11). НК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора РНК коронавируса кошек и собак.

Таблица 11

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

| Микроорганизмы и вирусы | |
|---|------------------------------|
| <i>Canine Parvovirus</i> (CPV) | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Feline Panleukopenia Virus</i> (FPV) | <i>Yersinia jejuni</i> |
| <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Escherichia coli</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 минус 24 °С до минус 16 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Допускается транспортирование не более 3 суток при температуре от 2 °С до 8 °С.

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

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от минус 24 °С до минус 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 Cor F/C, Буфера В и Реввертазы R 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® Коронавирус МДЖ» 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



Номер серии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению