



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-БЛЮТАНГ-ФАКТОР»
для выявления РНК вируса блютанга (Bluetongue virus, BTV) в
биологическом материале от жвачных методом обратной транскрипции и
полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов
амплификации в агарозном геле

21.10.60-160-51062356-2018

Для диагностики *in vitro*

Содержание

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

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
РНК	рибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор реагентов предназначен для выявления РНК вируса блютанга (Bluetongue virus, BTV) в биологическом материале от жвачных (цельная кровь, фрагменты тканей и органов, лимфоузлы), а также в кровососущих насекомых, переносчиках вируса, методом обратной транскрипции и амплификации кДНК с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

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

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР (Комплект №1) и контрольных образцов (Комплект №2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) Для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Состав комплекта №1

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР СМЕСЬ ФБТ	прозрачная жидкость зеленого цвета	830	1660	1
2	Смесь ферментов, RT PCR ENZ.	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	60	1
3	Буфер для разведения РНК, РНК буфер	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная вязкая бесцветная жидкость	2000	2000	1(2)

Таблица 2. Состав комплекта №2

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Положительный контрольный образец, ПКО ФБТ	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Внутренний контрольный образец, ВКО ФБТ	прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1

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

* Возможна легкая опалесценция

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

В набор реагентов не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических положительных сигнала компонентов набора реагентов в отношении НК других микроорганизмов: *Aphthae epizooticae*, *Parapoxvirus*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Rotavirus*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов НК от здоровых животных, кошки, собаки и человека.

4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Исследование проводится в два этапа в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также рабочие реагенты и расходные материалы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одной зоны в другую.

Процесс исследования является строго односторонним, работу следует начинать в зоне подготовки материала, продолжать в зоне экстракции нуклеиновых кислот, затем в зоне амплификации. Запрещается возвращать образцы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ

рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения РНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО РНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером и без (до 200 и 1000 мкл) в штативах (например, «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения РНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ОТ-ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терцик», РНК-технология).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).

- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,5 и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,5 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

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

Для зоны электрофоретического анализа

- Реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле по 2.2
- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «РНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат;
- Одноразовые перчатки.

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение

Для исследования используют следующий материал:

- Цельная кровь во время лихорадки. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

- Фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.) отбирают в стерильный контейнер.

- Лимфоузлы берут на исследование целиком

- Кровососущие насекомые, переносчики вируса (мокрецы), отбирают не менее 20 особей в контейнер.

Взятие клинического материала должно производиться в пробирки с транспортной средой.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при комнатной температуре – в течение 48 часов;

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение двух недель;

- при температуре не выше минус 20 °С – в течение месяца;

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание клинических образцов.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

6.2. Подготовка исследуемых проб

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, используют для выделения РНК без предварительной подготовки.

Исследуемые пробы тканей и органов происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12 тыс об/мин в течение 2 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции РНК.

Пробу кровососущих насекомых (использовать 20-40 особей) растирают в 1 мл стерильного физиологического раствора с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков. Полученные суспензии центрифугируют при 12 тыс об/мин в течение 1 мин. Для экстракции РНК используют 100 мкл надосадочной жидкости

7. Проведение анализа

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

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

7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО ФБТ**.

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

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

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

7.2. Подготовка образцов к проведению ОТ-ПЦР

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

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ФБТ, ВКО ФБТ и РНК Буфера**.

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

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

15 мкл **ПЦР Ф СМЕСЬ ФБТ**

0,5 мкл **RT PCR ENZ**.

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

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

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

В случае использования амплификаторов без нагрева крышек пробирок («Терцик», РНК технология) сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки (под масло или непосредственно на масло) внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл РНК буфера;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл НК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО ФБТ.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термочиклирования приведен в Таблице 3.

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

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 25 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	56°C – 40 сек	
	72 °C– 20 сек	
4	10°C	Хранение

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

7.3. Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле

Внимание: Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной НК методом гель-электрофореза

8. Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК.

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции НК в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Оценка результатов анализа контрольных образцов.

Контрольные образцы	Этап анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		217 пар нуклеотидов (Блютанг)	500 пар нуклеотидов (ВКО)
ВК-	Экстракция НК	нет	да
К+	ОТ-ПЦР	да	да
К-	ОТ-ПЦР	нет	нет

Появление специфической полосы ПЦР продукта 217 пн для отрицательного контроля этапа экстракции **ВК-** и полос 217 пн и/или 500 пн для отрицательного контроля этапа ПЦР **К-** свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа для всех проб считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

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

Образец считается **отрицательным (РНК вируса Блютанга отсутствует)** если не наблюдается амплификации специфической полосы на

уровне 217 пар нуклеотидов и при этом наблюдается специфическая полоса ВКО на уровне 500 пар нуклеотидов.

Образец считается **положительным (РНК вируса Блютанга)** если наблюдается полоса, подвижность которой совпадает с подвижностью нижней полосы (217 пар нуклеотидов) на дорожке К+ (ПКО ФБТ). Наличие полосы ВКО (500 пар нуклеотидов) при этом не обязательно.

Исследуемые образцы, для которых на дорожках отсутствуют обе полосы, требуют повторного проведения исследования. Отсутствие полосы ВКО (500 пар нуклеотидов) при отсутствии амплификации целевого ПЦР продукта Блютанга (217 пар нуклеотидов) указывает на наличие ингибиторов в пробе (ах) или на ошибки при постановке реакции. Необходимо провести исследование начиная с этапа экстракции НК.

9. Условия транспортирования

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

10. Условия хранения

Хранение комплектов набора «**ПЦР-Ф-БЛЮТАНГ-ФАКТОР**» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

11. Срок годности

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

Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций

Количество реакций	Объем ПЦР БУФЕРА ФБТ, мкл	Объем ПЦР СМЕСИ ФБТ, мкл	Объем RT PCR ENZ, мкл
5	50	25	2,5
10	100	50	5,0
15	150	75	7,5
19	190	95	9,5
23	230	115	11,5
27	270	135	13,5
31	310	155	15,5
35	350	175	17,5
39	390	195	19,5
43	430	215	21,5
47	470	235	23,5
51	510	255	25,5
55	550	275	27,5
59	590	295	29,5
63	630	315	31,5
67	670	335	33,5
71	710	355	35,5
75	750	375	37,5
79	790	395	39,5
83	830	415	41,5
87	870	435	43,5
91	910	455	45,5

Приложение 2. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений