



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК коронавирусной инфекции
собак – *Canine Coronavirus* в клиническом
материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме
«реального времени»

«Зайцев+[®] CoronaC»

C-04

Набор реагентов состоит из двух комплектов:

- «**Зайцев+® EXT**» - для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «**ПЦР-CoronaС**» - для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации РНК коронавирусной инфекции собак с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Комплект реагентов «Зайцев+® EXT» включает:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------|
| Лизирующий раствор | Прозрачная бесцветная жидкость | 9 | 4 флакона |
| Раствор для преципитации | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Раствор для отмывки 2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 50 | 1 флакон |
| Буфер для элюции НК | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 4 пробирки |

Комплект реагентов «ОТ-ПЦР-CoronaС» включает:

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i> | <i>Объем (мл)</i> | <i>Кол-во</i> |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------|
| ОТ-ПЦР-смесь-1-CoronaС | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| ОТ-ПЦР-смесь-2-РНК | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |
| Полимераза (TaqF) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,06 | 1 пробирка |
| Ревертаза (MMIV) | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01 | 1 пробирка |

К комплекту реагентов прилагаются следующие контрольные образцы:

| | | | |
|--|---------------------------------------|------|------------|
| Отрицательный контроль выделения НК | Прозрачная жидкость соломенно-желтого | 0,5 | 1 пробирка |
| Внутренний контроль «CoronaС-ВК» | Прозрачная жидкость соломенно-желтого | 0,5 | 1 пробирка |
| Положительный контроль ПЦР «CoronaС+» | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,05 | 1 пробирка |
| Отрицательный контроль ПЦР | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,05 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 100 проб, включая контрольные образцы.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов «Зайцев+® *CoronaС*», предназначенный для выявления РНК коронавирусной инфекции собак в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Принцип тестирования: выделение РНК *Canine Coronavirus* из клинического материала совместно с внутренним контрольным образцом; проведение обратной транскрипции и реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме «реального времени».

Набор реагентов рассчитан на 100 тестов, включая контрольные образцы.

ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.

Для проведения анализа возможно использование следующего клинического материала: плазма крови, ректальные мазки, кал. При исследовании кала материал предварительно необходимо развести в физрастворе. Кал весом 0,01-0,02 г (примерный размер рисового зерна) вносится в пробирку, содержащую 1 мл физраствора и тщательно перемешивается на вортексе. Затем пробирка откручивается на центрифуге при 3000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость

отбирают для анализа. Клинический материал пригоден для исследования в течение трех суток при хранении от 2-4°C.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Работают только в одноразовых перчатках, используют и меняют при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.
2. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2%-ный раствор ДП-2Т.
3. Анализ рекомендуется проводить в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения НК из клинического материала требуются.

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы» Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100°C (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 15 тыс. об/мин. (например, «Elmi», Латвия; «Hettish», Германия, «Sartorius», Германия).
4. Вортекс (например «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «Армед», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые, плотно закрывающиеся, полипропиленовые микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Артаса», Италия).

9. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, «Хеликон», Россия) и наконечников (например, «Артаса» Италия).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (например, «Артаса» Италия).
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером (например, «Tarson», Индия).
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения полимеразной цепной реакции требуются.

1. Амплификатор с детектирующей системой в режиме реального времени (например, CFX-96, BioRad, США; QuantStudio 3, Thermo FS, США, ДТ-96, ДНК-технология, Россия, Rotor-Gene Q 5plex, QIAGEN, Германия).
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, Thermo FS, США).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Tarson», Индия).
7. Штативы для наконечников (например, «Tarson», Индия) и микропробирок на 0,2 мл (например, «Хеликон», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Ёмкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

Проводится в ЗОНЕ-1 -комнате для обработки клинического материала.

Порядок работы.

1. Если в **лизирующем растворе** образовались кристаллы, то его необходимо прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка. Для выделения РНК из 24 проб (1 панель), включая контроли, в емкость с **лизирующим раствором** стерильным наконечником с барьером добавить 100 мкл **внутреннего контроля «CoronaС-ВК»**. Емкость тщательно перемешать. Если лизирующий раствор не был израсходован полностью, то его можно поместить в холодильник на 2 до 8 °С, затем использовать повторно (хранить не более трех суток).
2. В пробирки на 1,5 мл раскапать по 300 мкл приготовленного **лизирующего раствора**.
3. В каждую пробирку добавить по 100 мкл **клинического образца**, закрыть крышку и перемешать на вортексе.
4. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль выделения НК. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить 100 мкл **отрицательного контроля «ОК»**. Образец перемешать на вортексе.
5. Все пробирки перемешать на вортексе и поместить в термостат на 5 мин при температуре 65°С.
6. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки при 10 тыс. об/мин в течение 1 мин.
7. В каждую пробирку добавить 400 мкл **раствора для преципитации**. Пробирки тщательно перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре 5 мин.
8. Центрифугировать пробирки при 15 тыс. об/мин в течение 5 мин.
9. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель. Отбирать жидкость с осторожностью, не задевая осадка.

10. Добавить в пробирки по 400 мкл **раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 15 тыс. об/мин в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Добавить в пробирки по 400 мкл **раствора для отмывки 2**. Перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки при 15 тыс. об/мин в течение 1 мин. Отобрать надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Высушить осадок, поместив пробирки с открытыми крышками в термостат при 65 °С на 10 минут.
13. Растворить осадок в 50 мкл **Буфера для элюции НК**. Закрыть крышки пробирок, тщательно перемешать и прогреть в термостате при 65°С 5 минут. Перемешать на вортексе и поместить в центрифугу при 15 тыс. об/мин на 1 мин.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.

(Общий объем реакции - 25 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл)

Порядок работы:

1. Отобрать и подписать необходимое количество микропробирок на 0,2 мл (клинические образцы + положительный контроль ПЦР + отрицательный контроль ПЦР).
2. Приготовить реакционную смесь. Для этого в отдельной пробирке смешать **ОТ-ПЦР-смесь-2-РНК**, **полимеразу (TaqF)**, **ревертазу (MMV)** и **ОТ-ПЦР-смесь-1-CoronaC**. Объем смесей, полимеразы и ревертазы зависит от числа клинических образцов + контроли, из расчета на одну пробу необходимо добавить **9,5 мкл ОТ-ПЦР-смесь-2-ДНК + 0,5 мкл полимеразы (TaqF) + 0,1 мкл ревертазы (MMV) + 4,9 мкл ОТ-ПЦР-смесь-1-CoronaC**. Для простоты расчетов воспользуйтесь таблицей 1.

Таблица 1

| Количество образцов | ОТ-ПЦР-смесь-2-РНК мкл | Полимераза (TaqF) мкл | Реввертаза (MMIv) мкл | ОТ-ПЦР-смесь-1-CoronaC |
|---------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | 9,5 | 0,5 | 0,1 | 4,9 |
| 10 | 95 | 5 | 1 | 49 |
| 20 | 190 | 10 | 2 | 98 |
| 30 | 285 | 15 | 3 | 147 |
| 40 | 380 | 20 | 4 | 196 |
| 50 | 475 | 25 | 5 | 245 |
| 60 | 570 | 30 | 6 | 294 |
| 70 | 665 | 35 | 7 | 343 |
| 80 | 760 | 40 | 8 | 392 |
| 90 | 855 | 45 | 9 | 441 |
| 100 | 950 | 50 | 10 | 490 |

3. Внести в микропробирки по **15** мкл **готовой реакционной смеси**. Неиспользованные остатки реакционной смеси утилизировать.
4. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавить **10** мкл **РНК-пробы** в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
5. Для каждой постановки необходимо внести 2 контроля ПЦР: **отрицательный контроль** – в пробирку внести **10** мкл **Буфера для элюции НК**; **положительный контроль** амплификации – в пробирку внести **10** мкл **положительного контроля «CoronaC+»**
6. Установить пробирки в реакционный модуль.
7. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.
8. Установить в программе анализатора следующие параметры амплификации:
 1. 50°C – 20 минут
 2. 95°C – 15 минут
 3. 95°C – 15 секунд
60°C – 20 секунд

Количество циклов – 45.

Флюоресценцию измеряют при 60 °С на каналах HEX (JOE) и FAM.

9. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные - кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам - анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме реального времени. По каналу HEX регистрируют накопление продукта амплификации участка РНК коронавирусной инфекции собак – *Canine Coronavirus*, а по каналу FAM оценивают внутренний контроль. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов (см. описание для данного прибора).

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

1. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и выделения РНК (см. Таблицу).

| Контроли | Контролируемый этап | Результат по значению <i>Ct</i> | |
|------------------------|---------------------|---------------------------------|------------------------|
| | | Канал «HEX» | Канал «FAM» |
| Отрицательный контроль | Выделение РНК | отсутствует | <30 (положительный) |
| Положительный контроль | ПЦР | < 40 (положительный) | <30 (положительный) |
| Отрицательный контроль | ПЦР | отсутствует | отсутствует |

2. **Образец считается положительным**, если на канале HEX (JOE) получено значение *Ct* менее **40**, при этом значение *Ct* на канале

FAM менее **30**. При высоких концентрациях вируса в клиническом образце (C_t меньше 10) значение ВК по каналу FAM может быть более **30** или совсем отсутствовать, при этом такую пробу следует считать положительной.

3. **Образец считается отрицательным**, если на канале HEX (JOE) отсутствует значение C_t или получено значение C_t более **40**, при этом значение C_t на канале FAM менее **35**.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. В пробе с положительным контролем отсутствует сигнал. Возможная причина ошибки связана с приготовлением реакционных смесей. Необходимо приготовить реакционные смеси заново.
2. Для клинического образца отсутствует сигнал по двум каналам, при этом контроли ПЦР соответствуют установленным в инструкции требованиям. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере РНК или ингибированию ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
3. В отрицательном контроле (выделения или ПЦР) детектируется положительный сигнал. Возможная причина в контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток. При получении разукomплектовать.

Хранение. Комплекты реагентов «Зайцев+® EХТ» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект «ОТ-ПЦР-CoronaС» при длительном хранении хранить при температуре не выше минус 15 °С. При ежедневном использовании комплекта «ОТ-ПЦР-CoronaС» все его компоненты, кроме полимеразы (**TaqF**) и ревертазы, хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (**TaqF**) ревертазу (**MMIv**) хранить при температуре не выше минус 15 °С.

Рекламации на качество набора реагентов «Зайцев+® CoronaС» направлять по адресу предприятия-изготовителя ООО «Зайцев+»: 107023, г. Москва, Мажоров переулок, д. 10, офис 15101, тел. 8(495) 970-46-22, <http://pcr-kit.ru>, e-mail: vetlabplus@gmail.com