



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК возбудителя болезни
Ньюкасла птиц - *Pseudopestis avium* в
клиническом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
детекцией результатов в режиме «реального
времени»

«Зайцев+[®] NEW»

П-03

Набор реагентов состоит из двух комплексов:

- «Зайцев+® EXT» - для выделения РНК/ДНК из клинического материала;
- «ОТ-ПЦР-NEW» - для проведения обратной транскрипции и ПЦР-амплификации РНК возбудителя болезни Ньюкасла птиц - *Pseudopestis avium* с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Комплект реагентов «Зайцев+® EXT» включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
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	2	5 пробирок

Комплект реагентов «ОТ-ПЦР-NEW» включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ОТ-ПЦР-смесь-1-NEW	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
Рвертаза (MMIV)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	1 пробирка

К комплексу реагентов прилагаются следующие контрольные образцы:

Отрицательный контроль выделения НК	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета	0,5	1 пробирка
Внутренний контроль	Прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета	0,5	1 пробирка
Положительный контроль ПЦР «NEW+»	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+® NEW», для выявления РНК вируса возбудителя болезни Ньюкасла птиц - *Pseudopestis avium* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Принцип тестирования: выделение РНК вируса 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: респираторные мазки с пораженных участков респираторного тракта, истечения из носа и глаз, помет. Клинический материал пригоден для исследования в течение трех суток с момента взятия 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. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 15 тыс. об/мин. (например, «Elni», Латвия; «Hettich», Германия; «Sartorius», Германия).
4. Вortex (например «ЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «Армед», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Леншипт», Россия).
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые, плотно закрывающиеся, полипропиленовые микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Артас», Италия).
9. Шпатель для микропробирок на 1,5 мл (например, «Хеликон», Россия) и наконечников (например, «Артас» Италия).

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

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК 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, «Elni», Латвия; «Hettich», Германия; «Sartorius», Германия).
4. Вortex (например «ЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «Армед», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Леншипт», Россия).
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые, плотно закрывающиеся, полипропиленовые микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Артас», Италия).
9. Шпатель для микропробирок на 1,5 мл (например, «Хеликон», Россия) и наконечников (например, «Артас» Италия).

10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (например, «Артас» Италия).
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером (например, «Артас», Италия).
12. Холодильник от 2 до 8 °С.
13. Емкость 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, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленипипет», 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, «Артас», Италия).
7. Шпатель для наконечников (например, «Артас», Италия) 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. Емкость 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 «NEW-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 расканать 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 ДНК. 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 задывая осадка.
10. Добавить в пробирку 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 пробирку 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 (MMIv) и **ОТ-ПЦР-смесь-1-NEW**. 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 (MMIv) + 4,9 мкл ОТ-ПЦР-смесь-1-NEW**. Для простоты расчетов воспользуйтесь таблицей 1

Таблица 1.

Количество образцов	ОТ-ПЦР-смесь-2-РНК мкл	Полимераза (TaqF) мкл	Ревертаза (MMIv) мкл	ОТ-ПЦР-смесь-1-NEW
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 микропробирку 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 «NEW+»**
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.

Флуоресценцию 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 вируса возбудителя болезни Ньюкасла птиц - *Pseudopoxvirus avium*, 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 «С_t» 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 С _t	
		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 С_t менее **40**, при этом значение С_t на канале FAM менее **30**.

3. Образец считается **отрицательным**, если на канале HEX (JOE) отсутствует значение С_t или получено значение С_t более **40**, при этом значение С_t на канале FAM менее **30**.

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 разукрупнить.

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

Рекламации на качество набора реагентов «Зайцев+® NEW» направлять по адресу предприятия-изготовителя ООО «Зайцев+»: 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 9, стр. 8, 2 этаж, тел. 8(495) 150-08-07, <http://pcr-kit.ru>, e-mail: vetlabplus@gmail.com