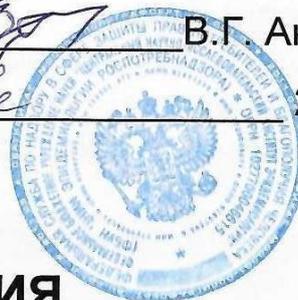


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

\_\_\_\_\_ В.Г. Акимкин  
« 29 » \_\_\_\_\_ 2023 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению тест-системы «*RABV*» для выявления РНК вируса Бешенства (*Rabies virus*) методом полимеразной цепной реакции

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «*RABV*» предназначена для выявления РНК вируса бешенства (*Rabies virus*) в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

#### ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления РНК вируса бешенства (*Rabies virus*) основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с РНК **экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-V)**, проведении реакции обратной транскрипции РНК, амплификации полученной кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО-V позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента

ревертазы (MMIv) и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции.

Результаты амплификации кДНК RABV, а также кДНК ВКО-V регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО-V	кДНК RABV

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

### Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Предел обнаружения, копий/мл <sup>1</sup>
Тканевой материал от животных (ткани головного мозга)	«РИБО-золь-АМ»	2,5x10 <sup>3</sup>
	RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	10 <sup>3</sup>

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

### Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность тест-системы доказана при исследовании РНК следующих вирусов: буньявирусы (*Bunyaviridae*): *Tahyna virus*, *Batai virus*, *Crimean-Congo haemorrhagic fever virus*, *Inkoo virus*; ортомиксовирусы (*Orthomyxoviridae*): *Dhori virus*; флавивирусы (*Flaviviridae*): *Yellow fever virus*, *West Nile virus*, *Tick-borne encephalitis virus*; тогавирусы (*Togaviridae*): *Sindbis virus*, *Chikungunya virus*, *Rubella virus*; реовирусы (*Reoviridae*): *Kemerovo virus*, *Rotavirus*;

<sup>1</sup> Количество копий гена-мишени в 1 мл исследуемого материала.

пикорнавирусы (*Picornaviridae*): *Enteric Cytopathic Human Orphan virus*; ретровирусы (*Retroviridae*): *HIV* (вирус иммунодефицита человека), а также геномной ДНК мыши, собаки, кошки и человека.

При тестировании образцов РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК мыши, собаки, кошки и человека неспецифических реакций выявлено не было. Специфичность тестирования подтверждалась методом секвенирования детектируемых фрагментов амплификации.

### **Повторяемость и воспроизводимость исследования**

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного оборудования. Условия воспроизводимости – тестирование разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий тест-системы. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

### **ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава тест-системы и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на результат анализа, полученный методом полимеразной цепной реакции:

- использование специфичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам выявляемых кДНК-мишеней;
- использование экзогенного внутреннего контроля (ВКО-V), добавляемого в каждый исследуемый образец на этапе экстракции РНК, результат амплификации которого учитывается при оценке валидности результатов анализа.

Критерием отсутствия влияния потенциально интерферирующих веществ является валидный результат ПЦР-исследования.

Ввиду указанных особенностей состава тест-системы и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

**Форма 1:** «РИБО-золь-АМ» вариант 100; «ПЦР-комплект» вариант FRT-96L-t

**Форма 2:** «ПЦР-комплект» вариант FRT-96L-t

Форма 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, реакцию обратной транскрипции, амплификацию кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма 2 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на экстракцию и проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

## СОСТАВ

**«РИБО-золь-АМ» вариант 100** – комплект реагентов для экстракции РНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Рибозоль-М	Прозрачная жидкость от желтого до оранжевого цвета	75	1 флакон
Раствор В	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор С	Прозрачная бесцветная жидкость	48	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Буфер для элюции А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок
тРНК	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	4 пробирки

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-96L-t** – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса бешенства (*RABV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>RABV-Lyo</i>	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
<b>K+ <i>RABV</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
<b>K-</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	4 пробирки
<b>ПКО <i>RABV</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
<b>ВКО-V</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии, и методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с тест-системой только персонал, обученный молекулярно-биологическим методам диагностики и правилам работы в лаборатории в установленном порядке.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все

- рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>2</sup>. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
  - Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, 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 сухожаровом 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.
  - Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).
  - Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
  - Не использовать тест-систему, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
  - Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
  - Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
  - Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по

---

<sup>2</sup> Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

## **СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку<sup>3</sup>, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

**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.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен,

---

<sup>3</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

Инк»), США, или аналогичные).

### **Предварительная подготовка исследуемого материала**

3. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200, до 1000 и до 5000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
9. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
10. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

### **Экстракция РНК из исследуемых образцов**

14. Наборы для экстракции РНК (например, RNeasy Lipid Tissue mini kit (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)) – при

работе с формой комплектации, не включающей комплект для экстракции.

15. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
16. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
20. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
21. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
22. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
24. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
25. Центрифуга-вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
26. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
27. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

### **Обратная транскрипция, амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

28. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc.

- («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные.
29. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
  30. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
  31. Центрифуга-вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
  32. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
  33. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), и другие, рекомендованные Изготовителем).
  34. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  35. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
  36. Емкость для сброса наконечников.

## **ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ**

Материалом для исследования служит тканевой материал от животных (ткани головного мозга).

**ВНИМАНИЕ!** Вид биологического материала для ПЦР-исследования определяет ветеринарный врач. При выборе биологического материала необходимо руководствоваться целью исследования, знаниями о патогенезе болезни и действующими регламентирующими документами.

### **Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала**

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Тканевой (аутопсийный) материал (ткани головного мозга) отбирают чистым стерильным инструментом (например, пинцет) в стерильные пластиковые контейнеры объемом 50 мл с плотно закрывающимися крышками или пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Материал доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С.

Допускается хранение материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 12 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительно.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 часов.

## **Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК**

Образцы тканевого материала требуют предварительной подготовки.

Тканевой материал объемом 30-50 мг гомогенизируют растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора, затем готовят 5% суспензию на охлаждённом стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для этого на 1 объём растёртой ткани добавляют 19 объёмов физиологического раствора или фосфатного буфера. Полученную смесь тщательно перемешивают и центрифугируют при 12 тыс g в течении 5 мин. Экстракцию проводят из 100 мкл надосадочной жидкости.

Допускается хранение предобработанных образцов тканевого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 12 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификации кДНК (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

## Экстракция РНК из исследуемого материала

При работе с Формой 1 используется комплект реагентов для экстракции РНК «РИБО-золь-АМ», входящий в состав тест-системы.

При работе с Формой 2 используются комплекты реагентов на основе сорбции РНК на силикагелевой мембране (например, RNeasy Lipid Tissue mini kit (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)).

Порядок работы с комплектом реагентов RNeasy Lipid Tissue mini kit смотрите в инструкции Изготовителя.

### Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-золь-АМ».

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

Отобрать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая положительный и отрицательный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО-V** и по **750 мкл Рибозоль-М**. Промаркировать пробирки.

В пробирки, содержащие **Рибозоль-М** и **ВКО-V**, внести по **100 мкл предобработанной исследуемой мозговой суспензии**, используя наконечники с фильтром.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл тРНК**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **80 мкл ОКО**, **10 мкл тРНК** и **10 мкл ПКО RAVV**. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** Использовать только ОКО, входящий в данный комплект реагентов.

Выдержать 10 мин при комнатной температуре.

Добавить в пробирки по **120 мкл раствора В**, перемешать на вортексе в течение 1 мин и инкубировать 5 мин в холодильнике при температуре от 2 до 8°C.

Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 13 тыс об/мин в течение 10 мин. Осторожно, не встряхивая, вынуть пробирки из микроцентрифуги. Содержимое пробирок должноделиться на две фазы: нижнюю и верхнюю.

**Раствор С** тщательно перемешать. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **450 мкл раствора С**. Промаркировать пробирки.

Не задевая промежуточной фазы, перенести **450 мкл верхней (водной) фазы** в пробирку, содержащую **450 мкл раствора С**, используя отдельные наконечники с фильтром. Все исследуемые образцы (включая отрицательный (ОК) и положительный (ПК) контроли экстракции) перемешать на вортексе и инкубировать в течение 20 мин в холодильнике при температуре не выше минус 16°C.

Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 13 тыс об/мин в течение 10 мин. Аккуратно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **1000 мкл раствора для отмывки 3**. Плотно закрыть крышки, перемешать переворачиванием. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 13 тыс об/мин в течение 10 мин. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы, полностью удалить надосадочную жидкость.

Поместить пробирки в термостат на 5 мин при температуре 60°C для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты). Осадок, содержащий очищенную РНК, можно хранить в течение 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

Добавить **50 мкл буфера для элюции А**, перемешать на вортексе в течение 2-3 мин.

Реакцию ОТ-ПЦР следует проводить сразу после получения РНК-пробы.

Очищенная РНК может храниться:

- при температуре от 2 до 8 °С – до 4 ч;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – до 1 года.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов RNeasy Lipid Tissue mini kit:

Экстракция РНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-V**.

Объем **ВКО-V** – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО, 10 мкл ПКО RABV**.

Объем элюции – **50 мкл**.

**Обратная транскрипция, амплификация и детекция продуктов амплификации**

**А. Подготовка проб для проведения ОТ-ПЦР**

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

**Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы РНК – 25 мкл.**

Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью RABV-Lyo** для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов.

В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

Поставить **контрольные реакции:**

- а) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ RABV**.
- б) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К-**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы,

экстрагированной из **ПКО RABV**.

**ВНИМАНИЕ!** Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

**ВНИМАНИЕ!** Провести ОТ-ПЦР сразу после соединения реакционной смеси с РНК-пробами и контролями.

### **Б. Проведение обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

### **Интерпретация результатов**

**ВНИМАНИЕ!** Результат ПЦР-исследования не является диагнозом. Оценка результатов исследования проводится ветеринарным врачом в соответствии с целью исследования и действующими регламентирующими документами.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 4

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-V	кДНК RABV

Результаты интерпретируют 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 РНК значения порогового цикла ( $C_t$ ).

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 5.

Таблица 5

### Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ПК	Экстракция РНК	$\leq 33$	$\leq 33$
ОК	Экстракция РНК	$\leq 33$	отсутствует
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	$\leq 28$	$\leq 28$

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 6

### Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
$\leq 35$	отсутствует	РНК RABV <b>НЕ обнаружена</b>
определено или отсутствует	$\leq 40$	РНК RABV <b>обнаружена</b>
$> 35$	отсутствует или определено больше граничного	<b>Невалидный*</b>

\* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

#### Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 5) отсутствует или превышает граничное значение (см. табл. 5). Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена РНК анализируемого микроорганизма. Необходимо повторить амплификацию таких образцов, а для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма, необходимо выполнить действия, указанные в п. 5.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и

JOE отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 5. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции, для всех образцов.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции.
4. Для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К-) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена РНК анализируемого микроорганизма. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию таких образцов.
5. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии или при анализе результатов в автоматическом режиме, требуется повторно провести амплификацию для этого образца.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

**Транспортирование.** Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут (для формы 1) и 10 сут (для формы 2) в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

### **Хранение.**

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-96L-t хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *RABV-Lyo* после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

«РИБО-золь-АМ» вариант 100 состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (Рибозоль-М, Раствор В, Раствор С, Раствор для отмывки 3, Буфер для элюции А) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме реагента тРНК.
- часть 2 (тРНК) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-96L-t хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *RABV-Lyo* после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Температура хранения вскрытых реагентов соответствует температуре хранения, указанной на этикетках для невскрытых реагентов.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «*RABV*» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программу Rotor-Gene Q или Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

#### А. Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

**ВНИМАНИЕ!** Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.

- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл.** Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска.**
- Нажать кнопку **Next/Далее.**
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля.**
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 7

### Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	50	15 мин	–	1
Hold 2/ Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling / Циклирование	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

- Нажать дважды кнопку **OK/Да.**
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых,** выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции.** Для каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал – 5FI** и **Max Reading/Максим. Сигнал – 10FI.** Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть.**
- Нажать кнопку **Next/Далее,** запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт.**
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец.**

## Б. Анализ результатов

### Анализ результатов по каналу FAM/Green:

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 8

Канал	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,05	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,05	включена	включена	10%

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Код партии



Дата изменения



Изготовитель



Дата изготовления



Осторожно!



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Использовать до



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света



Беречь от влаги



Знак обращения на рынке РФ