



УТВЕРЖДАЮ  
Директор  
ФКП «Щелковский биокомбинат»

О.В. Акилин  
«17» января 2023 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени - «ПЦР РВ Лейкоз-ЩБК» (Организация-разработчик: ФКП «Щелковский биокомбинат», 141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, п. Биокомбината)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование: «ПЦР РВ Лейкоз-ЩБК».

Международное непатентованное наименование: Тест-система для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени - «ПЦР РВ Лейкоз-ЩБК».

2. В состав набора входят следующие компоненты:

№ п/п	Состав тест-системы	Количество во флаконе	Количество флаконов	Количество определений
1	ПЦР-смесь	275 мкл	1	55
2	Фермент	275 мкл	1	
3	Буфер	550 мкл	1	
4	Контроль –	100 мкл	1	20
5	Контроль +	100 мкл	1	

3. Компоненты, входящие в состав тест-системы расфасованы в полипропиленовые микропробирки с завинчивающимися крышками вместимостью 2 см<sup>3</sup> и 0,5 см<sup>3</sup>.

Компоненты по внешнему виду представляют собой бесцветную прозрачную слегка опалесцирующую жидкость.

4. Микропробирки с компонентами тест-системы упакованы в полиэтиленовые пакеты Ziplok размером 80x120 мм. К каждой тест-системе прилагается инструкция по применению тест-системы.

Тест-системы в количестве 10 штук упакованы в полиэтиленовый пакет Ziplok размером 200x300 мм.

5. По требованию заказчика полиэтиленовые пакеты размером 200x300 мм с 10 тест-системами могут быть упакованы в ящики из гофрированного картона.

6. Срок годности тест-системы – 15 месяцев с даты изготовления. По истечении срока годности тест-система к применению не пригодна.

7. Тест-систему транспортируют и хранят в упаковке производителя в защищенном от света месте, при температуре минус (18-24) °С. Допускается многократное замораживание-оттаивание компонентов тест-системы и транспортирование при температуре (2-8) °С до семи суток.

8. Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

9. Не используемые компоненты в день применения следует хранить следующим образом: ПЦР-смесь, Фермент, Буфер, Контроль – и Контроль + сохраняют в замороженном состоянии при температуре минус (18-24) °С.

10. Микропробирки с компонентами тест-системы без маркировки, с нарушением

целостности и/или герметичности, с измененным цветом и/или консистенцией, с наличием посторонних примесей, с истекшим сроком годности, утилизируют.

Утилизация компонентов тест-системы не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

11. Тест-система предназначена для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале (цельная кровь) методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и для выявления гена домашнего хозяйства клеток хозяина, представленного в образце, в качестве эндогенного контроля этапа экстракции и амплификации.

12. Тест-система позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Считывание флуоресцентного сигнала производится непосредственно в ходе ПЦР.

13. Детекцию продуктов амплификации осуществляют в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

14. Тест-система не даёт неспецифических реакций компонентов в отношении НК других микроорганизмов: вируса гриппа А, возбудителя болезни Ауески, вируса диареи КРС, вируса инфекционного ринотрахеита КРС, вируса парагриппа-3 КРС, коронавируса КРС, *Brucella abortus*; *Brucella ovis*; *Brucella canis*; *Pasteurella multocida*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium avium*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter fetus*; *Clostridium perfringens*; *Salmonella dublin*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*.

Показано отсутствие неспецифических реакций целевых компонентов набора в отношении образцов ДНК здоровых животных, свиньи, КРС, курицы и человека.

Аналитическая чувствительность набора не менее 10 геном-эквивалентов на реакцию ( $10^{3,3}$  ГЭ/см<sup>3</sup>).

## III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

15. Для исследования используют цельную кровь. Исследования проводят для взрослых особей и телят старше 14-ти дневного возраста. Кровь отбирают из яремной или хвостовой вены в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1.

Желательно использовать одноразовые системы взятия крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Полученные образцы цельной крови транспортируют и хранят при температуре (2-8) °С – не более семи суток.

Замораживание цельной крови не допускается.

16. Исследуемые пробы готовят следующим способом.

Пробы цельной крови с ЭДТА используют для экстракции ДНК без предварительной подготовки.

17. Анализ с помощью тест-системы «ПЦР РВ Лейкоз-ЩБК» методом ПЦР РВ состоит из трех этапов: экстракция нуклеиновых кислот (НК), проведение реакции ПЦР РВ, учет результатов анализа.

18. Экстракцию НК проводят согласно инструкции к набору реагентов для выделения суммарной нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК) «Экстракт-С-ЩБК». Отрицательный контроль выделения является полезным для обнаружения контаминации на этапе пробоподготовки и рекомендуется к использованию. Для этого выделение проводят из элюента.

19. После разморозки все пробирки с компонентами набора следует кратковременно тщательно перемешать покачиванием или на вортексе. Сбросить капли кратковременным центрифугированием. В отдельной пробирке типа Эппендорф готовят реакционную ПЦР-смесь из расчета на одну пробу: В отдельной пробирке типа Эппендорф готовят реакционную ПЦР-смесь из расчета на одну пробу: Буфер в объеме 10 мкл, ПЦР-смесь в объеме 5 мкл,

Фермент в объеме 5 мкл. Полученную смесь кратковременно перемешивают на микроцентрифуге-Вортекс и сбрасывают капли кратковременным центрифугированием.

#### 20. Постановка ПЦР

Во все приготовленные для анализа ПЦР-пробирки вносят по 20 мкл полученной ПЦР смеси. Затем используя наконечники с аэрозольным барьером аккуратно в жидкость вносят:

- в пронумерованные пробирки с пробами - соответственно раствор с этапа выделения по 5 мкл;
- в пробирку помеченную (K-) отрицательный контроль по 5 мкл;
- в пробирку помеченную (K+) положительный контроль по 5 мкл предварительно его тщательно кратковременно перемешивают на вортексе или пипетированием с соблюдением предосторожностей. Перед открытием пробирок с контролем следует сбросить капли кратковременным центрифугированием.

При внесении проб в реакционную смесь содержимое пробирок тщательно перемешивают пипетированием с соблюдением предосторожностей во избежание образования капель, брызг, воздушных пузырей и аэрозолей. Пробирки закрывают крышками. Содержимое также можно кратковременно перемешать покачиванием на вортексе.

Кратковременным центрифугированием сбрасывают капли со стенок пробирок так, чтобы не осталось воздушных пузырей. Помещают пробирки в ячейки прибора для проведения ПЦР-РВ. И программируют прибор в соответствии с Приложением 1 (Ссылка: [https://biocombinat.ru/about/\\_Appendix%201.pdf](https://biocombinat.ru/about/_Appendix%201.pdf)) на режим из таблицы.

Схема программирования прибора для ОТ-ПЦР-РВ

№ п/п	Описание	Температурно-временной режим	Число циклов
1	активация фермента	95 °С – 10 мин	1
2	денатурация	95 °С – 10 сек	} 5
3	отжиг	58 °С – 20 сек	
4	элонгация	72 °С – 20 сек	
5	денатурация	95 °С – 10 сек	} 40
6	отжиг, считывание	58 °С – 20 сек канал FAM/GREEN, JOE/HEX/Yellow	
7	элонгация	72 °С – 20 сек	

Запускают прибор для исследования согласно инструкции.

#### 21. Учет результатов:

22.1 Проанализировать полученные данные с помощью программного обеспечения прибора.

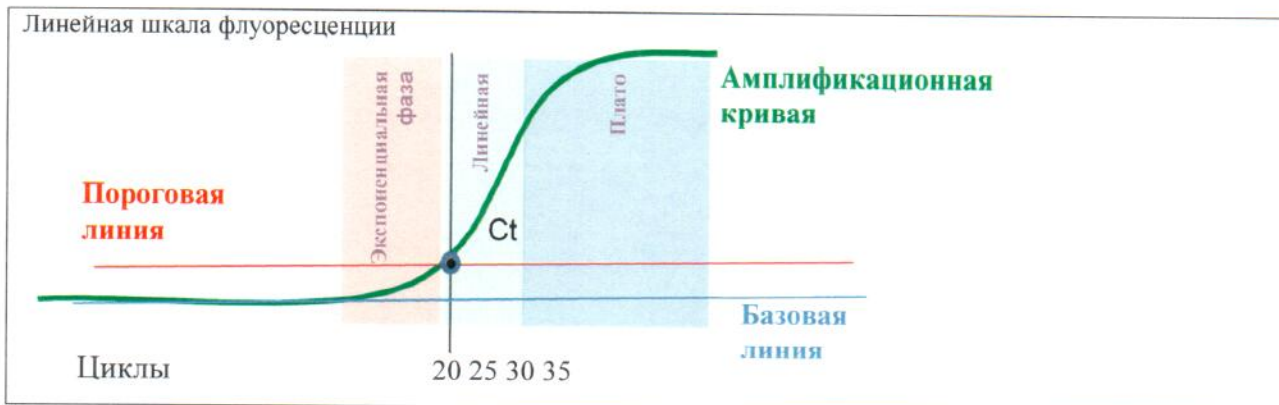
**Базовая линия** характеризует фоновую флуоресценцию на начальных циклах реакции. Определяется автоматически ПО или вручную.

**Амплификационная кривая** – график флуоресценции S-образной формы с экспоненциальной, линейной фазой и плато.

**Пороговая линия** – горизонтальная линия, определяющая границу выше фоновой флуоресценции, которая должна пересекать амплификационную кривую или группу кривых в точке перехода экспоненциальной фазы роста в линейную. Устанавливается автоматически ПО прибора или вручную оператором.

**Пороговый цикл (Ct)** – цикл, соответствующий точке пересечения на графике пороговой линии и амплификационной кривой.

Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции данного образца с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значений порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.



Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют по каналам:

- по каналу для флуорофора FAM/GREEN (далее FAM) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента генома провируса лейкоза крупного рогатого скота;
- по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow (далее JOE) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации гена домашнего хозяйства и успешного выполнения этапа экстракции НК и амплификации.

21.2 Результаты теста считаются достоверными в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации.

Контроли	Результат (значение Ct) на каналах	
	FAM/GREEN	JOE/HEX/Yellow
Контроль +	> 1...≤ 30	> 1...≤ 30
Контроль –	нет значений	нет значений / > 30

Кривые амплификации должны иметь выраженную S-образную форму.

21.3 **Отрицательный контроль** (далее К–) должен давать отрицательный результат ПЦР на канале FAM. Появление любого значения Ct для К– на канале FAM свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае источник контаминации выявляют, устраняют и анализ повторяют. Наличие сигнала по каналу JOE > 30 цикла для К– допускается и результаты теста подлежат учету.

21.4 **Положительный контроль** (далее К+) должен давать положительный результат ПЦР на каналах FAM, JOE, с Ct > 1...≤ 30. Отрицательный результат для К+ говорит о технических ошибках постановки или непригодности набора для дальнейшего использования. Если для К+ по любому каналу Ct отсутствует, анализ проводят повторно.

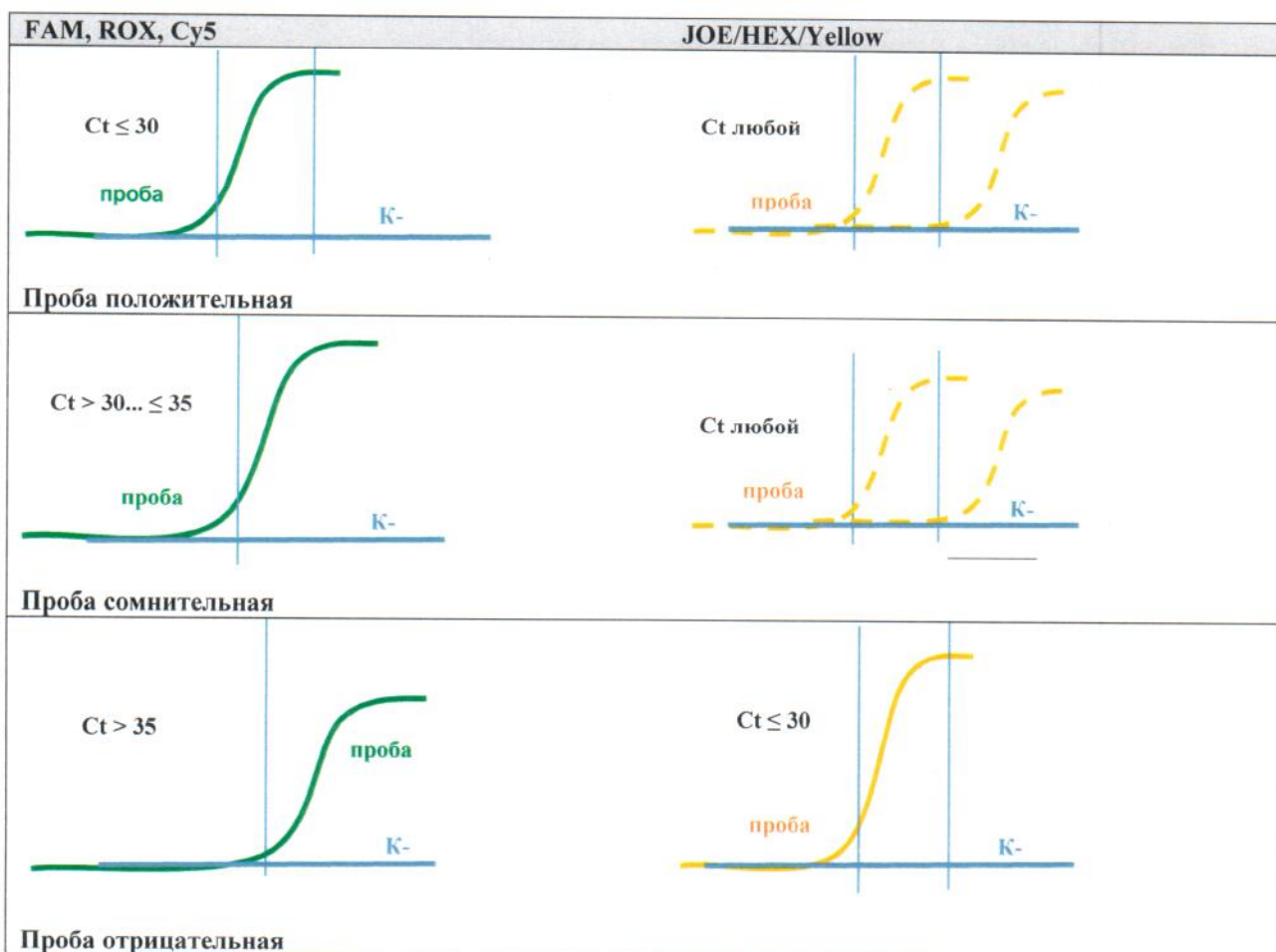
21.5 **Пробы считаются отрицательными**, если соответствующие им амплификационные кривые на канале FAM отсутствуют или имеют значение Ct ≥ 35. По каналу JOE при этом должна наблюдаться классическая амплификационная кривая со значением Ct ≤ 30.

21.6 **Пробы считаются положительными** независимо от наличия амплификационной кривой по каналу JOE, если кривые на канале FAM имеют специфическую S-образную форму, Ct ≤ 30.

21.7 **Пробы считаются ложноотрицательными**, если по каналу FAM получен отрицательный результат, а по каналу JOE наблюдается сомнительный результат (Ct > 30 и ≤ 35 или амплификационные кривые не имеют характерной формы) или отрицательный результат (амплификационные кривые отсутствуют или значение Ct > 35). Сомнительный или отрицательный результат по каналу JOE указывает на наличие ингибиторов в пробе или операционных ошибок пробоподготовки или постановки ПЦР анализа. Требуется переставить тест с момента выделения НК. При этом следует сделать 10x и 100x разведения пробы патологического материала. Также можно поставить тест с разведенной элюентом в 10x и 100x уже выделенной пробой.

**Отрицательный или сомнительный результат** по каналу JOE также **может указывать на деградацию ДНК хозяина**. При подозрении на деградацию рекомендуется повторный отбор проб и исследование. Также это может быть связано с изначальным отсутствием или заведомо малой концентрацией ДНК хозяина. В таких случаях **при исследовании проб крови материал считается непригодным для анализа и рекомендуется повторный отбор проб**.

21.8 **Пробы считаются сомнительными**, если по каналу FAM Ct > 30 и ≤ 35, или в случае Ct ≤ 30 форма кривой не вполне соответствует S-образной. Необходимо переставить тест с момента выделения НК. При этом следует сделать 10x и 100x разведения пробы патологического материала. Если результат повторной ПЦР будет отрицательный, то результат теста данной пробы принимается как отрицательный, в случае сомнительного результата рекомендуется повторный отбор материала и его анализ.



\*Наличие сигнала по каналу JOE/HEX/Yellow > 30 цикла для К- допускается и результаты теста подлежат учету

## 22. Оценка результатов анализа:

Показатель	Канал	Ct, Результат ПЦР			
		Ct ≤ 30 положительный	любой	любой	Ct > 30 сомнительный / отрицательный
Эндогенный ВК	JOE/HEX/ Yellow	Ct > 35 отрицательный	Ct ≤ 30 положительный	Ct > 30... ≤ 35 сомнительный	Ct > 30 сомнительный / отрицательный
Лейкоз	FAM/ GREEN	отрицательная	положительная	сомнительная (повторный анализ/отбор проб)	ложноотрицательная (ингибция/нет/мало/ разрушена ДНК хозяина)

## IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

23. При работе с тест-системой следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

24. Все лица, участвующие в проведении ПЦР исследований, должны быть одеты в спецодежду (халат, головной убор, резиновые перчатки). В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

25. При попадании компонентов тест-системы на кожу и/или слизистые оболочки их следует промыть большим количеством чистой водопроводной воды.

26. Организация-производитель: ФКП «Щелковский биокомбинат»,

141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, п. Биокомбината.

Инструкция по применению тест-системы для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени - «ПЦР РВ Лейкоз-ЩБК» разработана ФКП «Щелковский биокомбинат», 141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, п. Биокомбината.

С утверждением настоящей Инструкции отменяется «Инструкция по применению тест-системы для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени - «ПЦР РВ Лейкоз-ЩБК», утвержденная 21 июня 2022 г.

Сайт ФКП «Щелковский биокомбинат» [www.biocombinat.ru](http://www.biocombinat.ru)

E-mail: [info@biocombinat.ru](mailto:info@biocombinat.ru).

Тел.: (495) 134-5885; тел./ факс: (495) 134-5885 (доб. 888 или 502)