



Набор реагентов для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней
методом полимеразной цепной реакции в режиме
«реального времени» «АмплиПрайм® АЧС»

АмплиПрайм® АЧС

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2012-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

 **НекстБИО**
Биотехнологическая
компания

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	6
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	8
6.1. Взятие исследуемого материала	8
6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК	8
6.3. Экстракция НК из исследуемых образцов	9
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	10
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала	10
7.2. Подготовка материала к исследованию	11
7.2.1. Пулирование образцов биоматериала	12
7.3. Условия хранения материала для исследования	12
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция НК из исследуемого материала	12
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	13
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции.....	13
8.4. Анализ и обработка результатов	14
8.5. Интерпретация результатов	15
8.6. Возможные ошибки	17
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	18
9.1. Предел обнаружения	18
9.2. Аналитическая специфичность	18
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	19
10.1. Срок годности	19
10.2. Транспортирование.....	19
10.3. Хранение	19
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
К-	отрицательный контроль ПЦР
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОК	отрицательный контроль экстракции
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® АЧС».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® АЧС», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® АЧС» (далее по тексту - набор) предназначен для качественного определения ДНК вируса африканской чумы свиней в биологическом материале (цельная кровь, плазма, сыворотка крови; мазки со слизистой носоглотки и миндалин; патологический материал от павших животных (селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг)), продуктах свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и мясных изделиях (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.), инфицированных культурах клеток и в объектах ветеринарного надзора (смывы с поверхностей стен и конструкций животноводческих помещений, комбикорм, подстилка) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Набор реагентов используется в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь АЧС	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО АЧС	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов «АмплиПрайм® АЧС»	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹ и одновременной амплификации участков ДНК вируса АЧС и ДНК ВКО В (искусственно синтезированная последовательность) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси ДНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участок ДНК вируса АЧС и последовательность ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ²
ДНК-мишень	ДНК вируса АЧС	ВКО В
Область амплификации	Ген р72	Искусственно синтезированная последовательность

¹ ВКО В входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала.

² Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио» каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® АЧС» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор «АмплиПрайм® АЧС» применяется только для ветеринарных и других немедицинских целей.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® АЧС» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – «ВКО В», входящим в состав наборов реагентов для экстракции. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

4.6. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (утверждены приказом руководителя Роспотребнадзора 22 декабря 2009 г.) и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты, насадки для блендера и т.п.), использованные для предподготовки проб, 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 отмывания 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.

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения при проведении ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

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

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1% и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Вакуумные пробирки для забора крови с ЭДТА.

6.1.2. Вакуумные пробирки для забора крови без антикоагулянта.

6.1.3. Двухсторонняя игла для забора крови в вакуумную пробирку.

6.1.4. Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек ротовой и носовой полостей.

6.1.5. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант.

6.1.6. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл.

6.1.7. Пакеты и емкости для отбора, транспортирования и хранения полуфабрикатов, продуктов питания, однократного применения (Zip-Lock пакеты).

6.1.8. Физиологический раствор.

6.1.9. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки для центрифугирования типа «Falcon» объемом 50 мл.

6.2.3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.4. Фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.5. Ножницы.

6.2.6. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор.

6.2.7. Мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм.

6.2.8. Ватно-марлевые фильтры.

6.2.9. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.2.10. Стеклоянная воронка.

6.2.11. Анатомический пинцет.

6.2.12. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.13. Вортекс.

6.3. Экстракция НК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм® ВЕТ» («Формат 96») производства ООО «НекстБио», Россия или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (цельная кровь, плазма, сыворотка крови; мазки со слизистой носоглотки и миндалин; патологический материал от павших животных (селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг)), продукты свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и мясные изделия (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.), инфицированные культуры клеток и объекты ветеринарного надзора (смывы с поверхностей стен и конструкций животноводческих помещений, комбикорм, подстилка) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
- состав набора включает реагенты ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции НК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм® ВЕТ» («Формат Контроли»). Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов:

- плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие 2 и более независимых каналов флуоресцентной детекции с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

6.4.8. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 °С до 8 °С.

6.4.9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.10. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- образцы цельной крови, плазмы, сыворотки крови;
- мазки со слизистой носоглотки и миндалин от латентно инфицированных и больных животных;
- патологический материал от павших животных (селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг);
- продукты свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и мясные изделия (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.);
- инфицированные культуры клеток;
- объекты ветеринарного надзора (смывы с поверхностей стен и конструкций животноводческих помещений, комбикорм, подстилка).

Наиболее информативным клиническим материалом для выявления ДНК вируса АЧС является цельная кровь, пробы селезенки, лимфатических узлов, а также костного мозга из трубчатых костей.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

При отборе и транспортировке проб необходимо руководствоваться требованиями правил «Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов африканской чумы свиней» (утверждены приказом Минсельхоза РФ от 31 мая 2016 г. № 213).

Для получения сыворотки **кровь** отбирается в пробирку без антикоагулянта, для получения плазмы – в пробирку с антикоагулянтом. Забор крови проводят из яремной вены, нижней полой вены или ушной вены. Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Мазки со слизистой носоглотки и миндалин получают с помощью стерильного зонда, который вместе с материалом помещают в пробирку с транспортной средой.

Пробы органов/тканей массой не более 1 г отбирают в одноразовую пластиковую посуду или пластиковые пакеты, лимфоузлы берут целиком.

Трубчатые кости посылают на исследование целыми, с неповрежденными эпифизами.

Смывы с поверхностей стен и конструкций животноводческих помещений отбирают стерильными зонд-тампонами. Перед взятием смывов тампоны смачивают стерильным физиологическим раствором. После взятия смыва тампон погружают в емкость с физиологическим раствором.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток при температуре от 2 до 8 °С.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Кровь, культуры клеток и мазки со слизистой носоглотки и миндалин используется без предварительной подготовки.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10 мин при 1000 g. После этого переносят плазму в количестве 0,8 – 1,0 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл.

Сыворотку крови получают отстаиванием пробирки с цельной кровью при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800 – 1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.

Пробы тканей, органов, продуктов свиного происхождения и продуктов питания гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатно-солевом буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции ДНК.

Пробы комбикорма отбирают в соответствии с ГОСТ 13496.0.

Пробы подстилки отбирают из нескольких точек животноводческого помещения, из которых затем формируют среднюю пробу. Из средних проб комбикорма и подстилки готовят 5%-ные суспензии с использованием физиологического раствора и отстаивают в течение 10 минут для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый фильтр. Фильтрат собирают во флаконы объемом 50 мл и подвергают однократному замораживанию – оттаиванию. После оттаивания пробы осветляют при низкоскоростном центрифугировании при 2000 g в течение 20 мин. Супернатант фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм. После окончания фильтрации мембранные фильтры разрезают ножницами на мелкие кусочки, переносят стерильным анатомическим пинцетом в стерильный флакон, содержащий 10 мл физиологического раствора. Для обратной сорбции вирусов с фильтра флакон встряхивают в течение 10 мин с помощью шейкера. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1 мл в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10 000 g (12000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут. Из полученной суспензии проводят выделение ДНК. Для выделения нуклеиновых кислот используют 0,1 – 0,2 мл надосадочной жидкости.

7.2.1. Пулирование образцов биоматериала

При проведении массовых скрининговых и мониторинговых исследований для повышения скорости ПЦР-анализа допускается исследование пулов образцов биоматериала (образцы цельной крови, плазмы, сыворотки крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин, патологический материал от павших животных (селезенка, лимфоузлы, легкие, печень, сердце, костный мозг)). Образцы цельной крови, сыворотки и/или плазмы крови объединяют в пулы без предварительной подготовки. Мазки со слизистой носоглотки, миндалин и патологический материал от павших животных подвергаются пробоподготовке согласно п. 7.2. данной Инструкции.

Пулирование образцов провести по следующей схеме: в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл внести по 100 мкл образцов биоматериала от 2 – 5 животных. Содержимое пробирки перемешать на вортексе до гомогенного состояния, осадить капли со стенок пробирки кратким центрифугированием. Для выделения нуклеиновых кислот отобрать 100 мкл пулированного образца.

7.3. Условия хранения материала для исследования

Образцы исследуемого материала хранят при следующих условиях:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток (цельную кровь допускается хранить при данной температуре в течение 7 суток);
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание исследуемых образцов биоматериала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75%.

8.1. Экстракция НК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁴ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В)⁴.

³ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁴ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁵ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ВКО В – **10 мкл** в каждую экстрагируемую пробу;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ»), или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм® ВЕТ»), или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее применению.

8.2.1. Рассчитать объемы для **ПЦР-смеси АЧС** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь АЧС	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	5,0*(N+1)	

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью АЧС** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**.

⁵ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **ПКО АЧС**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОКО)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** реагента **К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G ⁶	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: необходимо перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению, инструкции по применению набора и краткому руководству, прилагаемому к набору.

⁶ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения амплификации с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно краткому руководству, прилагаемому к набору.

Обработка и расчет результатов происходит 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 ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2 каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G
Продукт амплификации	ДНК вируса АЧС	ВКО В

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 9 и кратким руководством, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 8 и кратком руководстве, прилагаемом к набору;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 8 – 9 и кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Таблица 8

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ПКО АЧС (положительный контроль)	Определено значение Ct не выше граничного ⁷	Отсутствует
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено не выше граничного ⁸ .	ДНК вируса АЧС не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора R6G не учитывается.	ДНК вируса АЧС обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено или отсутствует.	Результат сомнительный
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует или определено выше граничного.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

ВНИМАНИЕ! При получении **сомнительного результата** требуется повторить исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа отбора материала.

ВНИМАНИЕ! Получение сомнительных результатов ПЦР-исследования может свидетельствовать о наличии внутрилабораторной контаминации. Перед повторным исследованием образца рекомендуется провести деконтаминационные мероприятия. При получении при дополнительном ПЦР-исследовании значения Ct по каналу для флуорофора FAM больше граничного значения, образец считать положительным (ДНК вируса АЧС обнаружена).

Особенности интерпретации результатов для пулированных образцов биоматериала:

– Если при тестировании пулированного образца получен **отрицательный результат ПЦР (ДНК вируса АЧС не обнаружена)**, то все образцы, из которых собран пулированный образец, считаются **отрицательными** на наличие ДНК вируса АЧС;

– Если при тестировании пулированного образца получен **положительный результат ПЦР (ДНК вируса АЧС обнаружена)**, то необходимо по отдельности протестировать исходные образцы биоматериала для установления статуса индивидуальных образцов;

– Если при тестировании пулированного образца получен **сомнительный** или **невалидный результат ПЦР**, то необходимо по отдельности протестировать исходные образцы биоматериала, из которых собран пулированный образец. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо следовать указанным выше рекомендациям.

⁸ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM и R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.6.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM и R6G, что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения⁹

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® АЧС» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью и составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл. Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК вируса АЧС.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК вирусов и микроорганизмов (см. таблицу 10). ДНК вирусов и микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемый с помощью набора вирус АЧС.

Таблица 10

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизм/вирус	
Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней	<i>Escherichia coli</i>
Вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней	<i>Haemophilus parasuis</i>
Вирус эпидемической диареи свиней	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Цирковир свиней 2-го типа	<i>Lawsonia intracellularis</i>
<i>Chlamydia suis</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Mycoplasma hyopneumonia</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Brucella suis</i>	<i>Mycoplasma hyosynovia</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Pasterella multocida</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Salmonella Choleraesuis</i>
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	<i>Salmonella Dublin</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Chlamydophila pecorum</i>	<i>Streptococcus suis</i>

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных вирусов и микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

⁹ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование не более 3 суток при температуре от 8 до 25 °С.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси АЧС и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® АЧС» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Код партии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению