




Набор реагентов для выявления ДНК рыб семейства лососёвых *Salmo salar* (атлантический лосось), *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), *Oncorhynchus kisutch* (кижуч) методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч»

АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2041-1Z  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



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. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Взятие исследуемого материала	8
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала	8
6.3. Экстракция ДНК 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
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	12
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	13
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	14
8.4. Анализ и обработка результатов	15
8.5. Интерпретация результатов	15
8.6. Возможные ошибки	16
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
9.1. Предел обнаружения	17
9.2. Аналитическая специфичность	17
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	18
10.1. Срок годности	18
10.2. Транспортирование	18
10.3. Хранение	18
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

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

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК рыб семейства лососёвых *Salmo salar* (атлантический лосось), *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), *Oncorhynchus kisutch* (кижуч) методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч» предназначен для выявления ДНК рыб семейства лососёвых *Salmo salar* (атлантический лосось), *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), *Oncorhynchus kisutch* (кижуч) в биологическом материале (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, внутренние органы, части туши), полуфабрикатах рыбного происхождения, в продуктах питания, кормах для животных методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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 набора и комплектность поставки указаны в таблицах 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК методом ПЦР 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 используется для ручной методики выделения НК или совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь Лосось / Форель / Кижуч	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 Лосось / Форель / Кижуч	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	–	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 к набору для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования состоит из нескольких этапов. На первом этапе осуществляется экстракция ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹. На втором этапе проводится одновременная амплификация видоспецифических участков митохондриальной ДНК рыб семейства лососёвых *Salmo salar* (атлантический лосось), *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), *Oncorhynchus kisutch* (кижуч), а также ДНК внутреннего контрольного образца ВКО В (искусственно-синтезированная последовательность), при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-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 одновременно в одной пробирке проводится 4 реакции – амплификация видоспецифических участков митохондриальной ДНК лосося, форели и кижуча, а также амплификация ДНК внутреннего контрольного образца ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по четырём различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ²	ROX	Cy5
НК-мишень	ДНК рыб <i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	ДНК рыб <i>Oncorhynchus mykiss</i> (радужная форель)	ДНК рыб <i>Oncorhynchus kisutch</i> (кижуч)	ВКО В
Область амплификации	мтДНК	мтДНК	мтДНК	Искусственно-синтезированная последовательность

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

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

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

4. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор 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. Непригодными для исследования являются образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта и образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

4.5. С помощью набора «АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом экстракции – «ВКО В», входящим в состав набора для проведения экстракции НК. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.6. Анализ пищевых продуктов с истекшим сроком годности, или хранившихся с нарушением требуемых условий, может показать невалидные результаты. Пищевые продукты в процессе транспортировки необходимо хранить в рекомендованных производителем условиях.

4.7. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

4.8. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным 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» 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 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.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

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, цитратом натрия или активатором свертывания крови.

6.1.2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые с вакуумными пробирками.

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

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

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

6.1.6. Одноразовые перчатки.

6.1.7. Ножницы, скальпели, пинцеты.

6.1.8. Шпатель.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

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

6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5, 15 или 50 мл.

6.2.3. Стерильные фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.4. Вортекс.

6.2.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 мл с ускорением не менее 10000g.

6.2.6. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» с ускорением не менее 2000g.

6.2.7. Ножницы, скальпели, пинцеты.

6.2.8. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор.

6.2.9. Мембранные фильтры с диаметром пор 450 мкм.

6.2.10. Ватно-марлевые фильтры.

6.2.11. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.12. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.13. Стеклянная или полипропиленовая воронка.

6.2.14. Аналитические или прецизионные весы.

6.2.15. Деионизированная вода 1 типа.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК «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 НК из биологического материала (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, внутренние органы, части туши), полуфабрикатов рыбного происхождения, продуктов питания, кормов для животных для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- состав набора включает реагент 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 ДНК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм® ВЕТ» формы выпуска «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/РНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или 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/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 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. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

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

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX и Cy5 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
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690

- 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.

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

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

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит:

- биологический материал (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, внутренние органы, части туши);
- полуфабрикаты рыбного происхождения;
- продукты питания;
- корма для животных.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с ГОСТ 31719 (раздел 5), ГОСТ 34106—2017 (раздел 7), ГОСТ 31339-2006 и ГОСТ 13496.0. Отбор, транспортирование и хранение исследуемых образцов следует проводить в соответствии с требованиями ГОСТов на соответствующий вид продукции.

Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах.

При отборе проб необходимо соблюдать меры по предотвращению контаминации образцов. Для этого отбор проб проводят в перчатках, а инструменты, применяемые для отбора и измельчения материала, используют однократно или обрабатывают моющими средствами и стерилизуют в пламени спиртовки или газовой горелки при переходе от одной пробы к другой с использованием одноразовых герметично закрывающихся пластиковых контейнеров или пакетов.

Каждую отобранную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, номера партии, даты отбора проб, цели исследования, подписей лиц, отбравших пробу.

Внутренние органы массой не более 1 г отбирают в стерильные контейнеры (пробирки).

Части туши (образцы мышечной ткани) рыбы отбирают из середины тушки пинцетом или шпателем, предварительно сделав разрез ножницами или скальпелем.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Взятие **крови** проводится после длительного голодания (не менее 6 часов) в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия), либо с активатором свертывания крови.

Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Пробирку с активатором свертывания крови не переворачивают, оставляют для образования сгустка.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 2 суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Кровь используется без предварительной подготовки.

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

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

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 одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.

Допускается хранение образцов сыворотки крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Пробы органов, частей туши, полуфабрикатов рыбного происхождения и продуктов питания, корма для животных гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатно-солевом буфере, или воде первого типа. Суспензию переносят в пробирку (объем пробирки зависит от объема приготовленной суспензии) и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции ДНК.

Пробы икры в количестве трех икринок переносят в чистую пробирку, добавляют в неё 500 – 600 мкл физиологического раствора, затем икринки прокалывают одноразовым наконечником. Содержимое пробирки перемешивают и удаляют оболочку икринок. Полученный раствор используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории³:

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

8.1. Экстракция ДНК 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.

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).

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 пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- 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).

ВНИМАНИЕ! Не рекомендуется использовать для экстракции ДНК из проб икры набор реагентов «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» или другие аналогичные ему наборы экстракции, основанные на принципе спиртового осаждения, из-за их низкой эффективности при работе с данным видом биологического материала.

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 использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Лосось / Форель / Кижуч** 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 Лосось / Форель / Кижуч	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 Лосось / Форель / Кижуч** 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, полученных 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.

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

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**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) положительный контроль ПЦР (ПК) – в одну пробирку для образца **ПК** внести **10 мкл ПКО Лосось / Форель / Кижуч**.

б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в одну пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в одну пробирку для образца **К-** 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 , ROX, Cy5	

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 минут) 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».

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

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.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР 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 4-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК рыб <i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	ДНК рыб <i>Oncorhynchus mykiss</i> (радужная форель)	ДНК рыб <i>Oncorhynchus kisutch</i> (кижуч)	ДНК ВКО

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 в 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 и 9 соответственно, и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Sy5
ПКО Лосось / Форель / Кижуч (положительный контроль)	Определено значение Ct не выше граничного ⁷			Отсутствует
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты	Интерпретация
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G и / или ROX отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Sy5 определено не выше граничного ⁷ .	ДНК атлантического лосося и / или ДНК радужной форели и / или ДНК кижуча не обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G и / или ROX определены не выше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данным каналам пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора Sy5 определено или отсутствует.	ДНК атлантического лосося и / или ДНК радужной форели и / или ДНК кижуча обнаружена
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G и / или ROX определены выше граничного, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Sy5 определено не выше граничного.	Результат недостоверный / сомнительный Рекомендуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора Sy5 отсутствует или определено выше граничного, при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX отсутствуют или определены выше граничного.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

ВНИМАНИЕ! В случае получения сомнительного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения сомнительного или получения отрицательного результата, необходимо провести повторное ПЦР-исследование, начиная с этапа отбора материала.

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и / или R6G, и / или ROX определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация 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 каналам для флуорофоров FAM и / или R6G, и / или ROX, и / или Sy5 определены значения пороговых циклов (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.

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

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/ПЦР и детекцию для этого образца.

8.6.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX и Cy5, 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 обнаружения⁸

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Лосось / Форель / Кижуч» был определен с использованием пробит-анализа с 95 %-ой доверительной вероятностью и составляет $5,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК *Salmo salar* (атлантический лосось), $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК *Oncorhynchus kisutch* (кижуч) (см. таблицу 10). Значение характеристики достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Предел обнаружения, копий/мл
ДНК <i>Salmo salar</i> (атлантический лосось)	$5,0 \times 10^3$
ДНК <i>Oncorhynchus mykiss</i> (радужная форель)	$1,0 \times 10^3$
ДНК <i>Oncorhynchus kisutch</i> (кижуч)	$1,0 \times 10^3$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК *Salmo salar* (атлантический лосось), ДНК *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), ДНК *Oncorhynchus kisutch* (кижуч).

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов (см. таблицу 11). НК микроорганизмов в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора ДНК *Salmo salar* (атлантический лосось), ДНК *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), ДНК *Oncorhynchus kisutch* (кижуч).

Таблица 11

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы	
Белорыбца (<i>Stenodus leucichthys</i>)	Чавыча (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)
Обычный сиг (<i>C. Lavaretus</i>)	Арктический голец (<i>Salvelinus alpinus</i>)
Ленок (<i>Brachymystax lenok</i>)	Кумжа (<i>Salmo trutta</i>)
Горбуша (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	Кета (<i>Oncorhynchus keta</i>)
Нерка (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

⁸ 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 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

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

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

10.3. Хранение

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

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 Лосось / Форель / Кижуч 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® Лосось / Форель / Кижуч» 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