



Набор реагентов для выявления ДНК/РНК возбудителей респираторно-синцитиальной инфекции, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ»

«АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ»

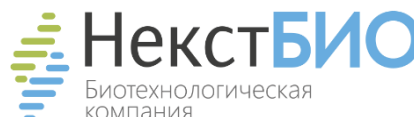
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2153-1Z  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



Биотехнологическая
компания

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ.....	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРОВ	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	7
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Взятие исследуемого материала.....	8
6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК/РНК	9
6.3. Экстракция ДНК/РНК из исследуемого материала.....	9
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	10
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	11
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала.....	11
7.2. Подготовка материала к исследованию	11
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция ДНК/РНК из исследуемого материала.....	12
8.2. Подготовка реагентов для ОТ-ПЦР.....	12
8.3. Внесение проб ДНК/РНК, проведение амплификации и детекции	13
8.4. Анализ и обработка результатов.....	14
8.5. Интерпретация результатов	14
8.6. Возможные ошибки.....	15
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	16
9.1. Аналитическая чувствительность	16
9.2. Аналитическая специфичность.....	16
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	17
10.1.Срок годности	17
10.2.Транспортирование.....	17
10.3.Хранение	17
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	17
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	18

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	дезоксирибонуклеаза
кДНК	комплементарная ДНК
ИРТ	инфекционный ринотрахеит
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНКаза	рибонуклеаза
РСИ	респираторно-синцитиальная инфекция
РС-вирус	респираторно-синцитиальный вирус
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК/РНК возбудителей респираторно-синцитиальной инфекции, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ» (далее по тексту - набор) предназначен для выявления ДНК/РНК возбудителей респираторно-синцитиальной инфекции (РСИ), парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота в патологическом материале от латентно инфицированных, больных и вынужденно убитых животных (цельная кровь, сыворотка крови, мазки со слизистой оболочки носовой полости, мазки со слизистой оболочки влагалища, сперма, пробы органов и тканей (лимфоузлы, фрагменты носовой перегородки, трахеи, лёгких, печени, селезёнки)) и в инфицированных культурах клеток методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

2.ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРОВ

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 реакции обратной транскрипции ДНК/РНК и амплификации полученной кДНК с гибридизационно-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/РНК, 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 РСИ/Парагрипп-3/ИРТ	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,70	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
Ревертаза R	0,055	1 пробирка	Буферный раствор с РНК-зависимой ДНК-полимеразой. Прозрачная жидкость.
ПКО РСИ/Парагрипп-3/ИРТ	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,30	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	–	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде по адресу: nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде по адресу: nextbio.ru	-
Вкладыш для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования состоит из нескольких этапов. На первом этапе осуществляется экстракция ДНК/РНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В)¹. На втором этапе проводится одновременная амплификация ДНК вируса ИРТ, кДНК, синтезированной на матрицах геномной РНК респираторно-синцитиального вируса и вируса парегриппа-3, и кДНК, синтезированной на матрице РНК внутреннего контрольного образца ВКО В (искусственно синтезированная последовательность), при помощи специфичных к этому участку праймеров и ферментов Ревертазы R и 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 кДНК-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 ОТ-ПЦР одновременно в одной пробирке проходит амплификация ДНК вируса ИРТ, кДНК, синтезированной на матрицах геномной РНК РС-вируса и вируса парагриппа-3, и кДНК, синтезированной на матрице РНК последовательности ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 4-м различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

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

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ²	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ВКО В	ДНК вируса ИРТ	кДНК, синтезированная на матрице РНК РС-вируса	кДНК, синтезированная на матрице РНК вируса парагриппа-3
Область амплификации	искусственно синтезированная последовательность	ген оболочечного гликопротеина В (UL27)	ген нуклеокапсидного протеина (N)	ген фосфопротеина (Р)

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ» 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. С помощью набора «АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ» возможно ОТ-ПЦР-исследование только проб ДНК/РНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом «ВКО В», входящим в состав набора для проведения экстракции ДНК/РНК. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

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

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

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

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 ОТ-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 (стопки 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 сушильном 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 ОТ-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. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл.

6.1.2. Вакуумные пробирки для забора крови без антикоагулянта.

6.1.3. Двухсторонние иглы для забора крови в вакуумные пробирки.

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

6.1.5. Пластиковый пакет с застежкой Zip-lock.

6.1.6. Ножницы, скальпели, пинцеты.

6.1.7. Шпатель одноразовый для взятия биологического материала.

6.1.8. Стерильная посуда.

6.1.9. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант или стерильный физиологический раствор.

6.1.10. Бактериологическая петля.

6.1.11. Зонд для взятия биологического материала со слизистых оболочек.

6.1.12. Вакуумные пробирки для забора крови с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия).

6.1.13. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

6.2. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК/РНК

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

6.2.2. Стерильные фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.3. Вортекс.

6.2.4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 мл.

6.2.5. Ножницы, скальпели, пинцеты, лопатка.

6.2.6. Фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор (стерильный изотонический раствор хлорида натрия).

6.2.7. 10 – 15% раствор глицерина.

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

6.2.9. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.10. Транспортная среда для взятия, хранения и транспортирования биологического материала, содержащая консервант или стерильный физиологический раствор.

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

6.2.12. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» с ускорением не менее 2 000 g.

6.3. Экстракция ДНК/РНК из исследуемого материала

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

- набор позволяет выделять ДНК/РНК из патологического материала от латентно инфицированных, больных и вынужденно убитых животных (цельная кровь, сыворотка крови, мазки со слизистой оболочки носовой полости, мазки со слизистой оболочки влагалища, сперма, пробы органов и тканей (лимфоузлы, фрагменты носовой перегородки, трахеи, лёгких, печени, селезёнки)), а также из инфицированных культур клеток для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

- 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/РНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции ДНК/РНК 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/РНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК/РНК.

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 четырех и более 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 ³	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 99 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,5$ °С;
- скорость нагрева не менее 1,5 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

6.4.9. Холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температурный режим от минус 24 °С до минус 16 °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.

³ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит:

- Патологический материал от латентно инфицированных, больных и вынужденно убитых животных (цельная кровь, сыворотка крови, мазки со слизистой оболочки носовой полости, мазки со слизистой оболочки влагалища, сперма, пробы органов и тканей (лимфоузлы, фрагменты носовой перегородки, трахеи, лёгких, печени, селезёнки));
- Инфицированные культуры клеток.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

Для получения **сыворотки** кровь отбирают в пробирку без антикоагулянта. Забор крови проводят из яремной или хвостовой вены. Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Мазки со слизистой оболочки носовой полости и влагалища получают с помощью стерильного зонда, который вместе с материалом помещают в пробирку с транспортной средой.

Сперму отбирают в объеме 1,5 – 2,0 мл в пластиковые контейнеры для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50 – 60 мл.

Пробы органов и тканей (лимфоузлы, фрагменты носовой перегородки, трахеи, лёгких, печени, селезёнки) массой не более 1 г отбирают в стерильные пластиковые контейнеры или пакеты с застежкой Zip-lock.

Инфицированные культуры клеток отбирают в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл.

Образцы исследуемого материала транспортируют при следующих условиях:

- при температуре от 2 °C до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 16 °C – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение требований может привести к получению некорректных результатов.

7.2. Подготовка материала к исследованию

Цельную кровь, культуры клеток и мазки со слизистой оболочки носовой полости и влагалища используют без предварительной подготовки.

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

Сперму непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот, используя наконечник с фильтром, переносят 50 мкл спермы в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл и добавляют 150 мкл транспортной среды, тщательно перемешивают пробу на вортексе.

Пробы органов и тканей (лимфоузлы, фрагменты носовой перегородки, трахеи, лёгких, печени, селезёнки) 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/РНК.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории⁴:

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

8.1. Экстракция ДНК/РНК из исследуемого материала

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

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)⁵ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК/РНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В).

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

- объем **исследуемого образца**⁶ – **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/РНК**, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции ДНК/РНК «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 ОТ-ПЦР

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

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

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси РСИ/Парагрипп-3/ИРТ, Ревертазы R 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 РСИ/Парагрипп-3/ИРТ	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК/РНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	5,0*(N+1)	
Ревертаза R	0,5*(N+1)	

⁴ 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».

⁵ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁶ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.2.2. Разморозить содержимое пробирок с ПЦР-смесью РСИ/Парагрипп-3/ИРТ, Буфером В и Ревертазой R.

8.2.3. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью РСИ/Парагрипп-3/ИРТ и Буфером В на вортексе, пробирку с Ревертазой R аккуратно перемешать пипетированием. Сбросить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

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

8.2.5. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.6. Внести в пробирки по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК/РНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК/РНК, 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/РНК.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) **положительный контроль ПЦР (ПКО)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ПКО РСИ/Парагрипп-3/ИРТ.

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, °C	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 ⁷ , 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 °C – 15 минут) для экономии времени.

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

⁷ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

Примечание: необходимо перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

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 «ИЛС», Россия), выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору.;
- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом 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 кДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых (см. п. 8.5.) 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 ⁸	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ВКО В	ДНК вируса ИРТ	кДНК, синтезированная на матрице РНК РС-вируса	кДНК, синтезированная на матрице РНК вируса парагриппа-3

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 12. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;
- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИЛС», Россия), выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 11 и 12 соответственно, и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

⁸ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
ПКО РСИ/Парагрипп-3/ИРТ (положительный контроль ПЦР)	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного ⁹	Определено значение Ct не выше граничного	Определено значение Ct не выше граничного
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 12

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX и/или Cy5 определены. При этом кривые флуоресценции исследуемой пробы по данным каналам пересекают пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено или отсутствует.	ДНК вируса ИРТ и/или РНК РС-вируса и/или РНК вируса парагриппа-3 обнаружены
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX и/или Cy5 отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного⁹.	ДНК вируса ИРТ и/или РНК РС-вируса и/или РНК вируса парагриппа-3 не обнаружены
Значения Ct по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX и/или Cy5 отсутствуют, при этом значение Ct по каналу для флуорофора FAM определено выше граничного или отсутствует.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. 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 ОТ-ПЦР и детекцию для этого образца.

8.6.2. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) по каналам для флуорофоров R6G и/или ROX и/или Cy5 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/РНК.

8.6.3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 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.

8.6.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM, 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 Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора «АмплиПрайм® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ» составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК вируса ИРТ, РНК РС-вируса и вируса парагриппа-3 (см. таблицу 13). Значения характеристик достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 13

Предел обнаружения набора

Вирус	Предел обнаружения, копий/мл
Вирус инфекционного ринотрахеита	$1,0 \times 10^3$
Респираторно-синцитиальный вирус	$1,0 \times 10^3$
Вирус парагриппа-3	$1,0 \times 10^3$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК вируса ИРТ, РНК РС-вируса и вируса парагриппа-3.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК вирусов и микроорганизмов (см. таблицу 14). НК вирусов и микроорганизмов в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора ДНК вируса ИРТ, РНК РС-вируса и вируса парагриппа-3.

Таблица 14

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Вирус гриппа А	<i>Clostridium perfringens</i>
Вирус диареи КРС	<i>Escherichia coli</i>
Вирус лейкоза КРС	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Brucella ovis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	

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

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 2 °С до 8 °С.

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

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от -24 °С до -16 °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 РСИ/Парагрипп-3/ИРТ, Ревертазы R и Буфера B, 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® РСИ/Парагрипп-3/ИРТ» 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: nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Каталожный номер



Изготовитель



Номер серии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Срок годности



Число исследований



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению