

ФКП «Армавирская биофабрика»

REF

VD-003-23



АМПЛИ-ВЕТ-КАПРИПОКСВИРУСЫ

Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* (вируса нодулярного дерматита *Lumpy skin disease virus*, вирусов оспы коз и овец *Sheeppox virus/Goatpox virus*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)

Лизирующий раствор, ЛОР	60 мл	1 флакон
Сорбирующий раствор, СР	5 мл	1 флакон
Промывочный раствор, ПР	60 мл	2 флакона
Элюирующий раствор, ЭР	13 мл	1 флакон
Отрицательный контрольный образец выделения, ОКО-В	1 мл	1 пробирка
Реакционная смесь, РС АМПЛИ-ВЕТ-КАПРИПОКСВИРУСЫ	0,005 мл	14 стрипов по 8 микропробирок
Положительный контрольный образец, ПКО-КАПРИПОКСВИРУСЫ		1 пробирка
Раствор для разбавления ПКО, ОКО	1 мл	1 пробирка
Внутренний положительный контроль, ВПК	1 мл	1 пробирка

FAM, R6G, ROX, Cy5



010323

2024-03

2023-03

112



352212, Россия, Краснодарский край, Новокубанский район, п. Прогресс, ул. Мечникова, 11
Тел. (86195)-2-11-15, факс 4-10-26

Для профессионального
применения

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКП
«Армавирская биофабрика»
Е.В. Суеский
« 16 » 2023 г



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* (вируса нодулярного дерматита *Lumpy skin disease virus*, вирусов оспы коз и овец *Sheeppox virus/Goatpox virus*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)
«Ампли-Вет-Каприпоксвирусы»

2023

Срок годности 12 мес.

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
1.1 Полное наименование набора.....	4
1.2 Назначение набора и его диагностическая роль	4
1.3 Область применения набора.....	5
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	5
2.1 ФОРМЫ ВЫПУСКА	5
2.2.1 Набор реагентов для выделения ДНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher и их аналогах Flex System «М- Сорб-Вет-ДНК».....	5
2.2.2 Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Вет- Каприпоксвирусы»	6
2.3 МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
2.3.1 Принцип метода выделения ДНК	6
2.3.2 Принцип метода выявления ДНК каприпоксвирусов.....	7
2.4 ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА.....	7
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
3.1 Чувствительность	8
3.2 Специфичность	8
3.3 Повторяемость и воспроизводимость.....	11
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	11
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	14
5.1 РЕКОМЕНДУЕМОЕ ИЗМЕРИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ.....	14
5.2 УКАЗАНИЯ О НЕОБХОДИМОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИАЛЬНОГО ОБОРУДОВАНИЯ.....	14
5.3 ДОЗИРУЮЩИЕ УСТРОЙСТВА	15
5.4 ДРУГОЕ ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
5.4.1 Для выделения ДНК ручным методом	15
5.4.2 Для постановки ПЦР-РВ	15
5.5 ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА	15
5.6 МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	15
5.6.1 Для выделения ДНК ручным методом	15
5.6.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях.....	15
5.6.3 Для постановки ПЦР-РВ	16
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ	16
6.1 Тип исследуемых образцов	16
6.2 Процедура получения биологического материала.....	16
6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала	16
6.4 Подготовка анализируемого материала	17

6.5 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ВОЗМОЖНОГО ХРАНЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	17
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	18
7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК НАБОРОМ «М-СОРЬ-ВЕТ-ДНК»	18
7.1.1 Проведение выделения ДНК ручным методом	18
7.1.2 Выделение ДНК на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и их аналогах.	21
7.1.3 Условия хранения анализируемых проб (образцов ДНК).....	22
7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ «АМПИ-ВЕТ- КАПРИПОКСВИРУСЫ»	22
7.2.1 Подготовка к проведению ПЦР-РВ	22
7.2.2 Проведение ПЦР-РВ на приборах RotorGene6000/RotorGeneQ	24
7.2.3 Проведение ПЦР-РВ на приборах CFX96.....	27
7.2.3 Проведение ПЦР-РВ на приборах АНК-32 (32М, 48)	30
7.2.3. Проведение ПЦР-РВ на приборах Dtprime / Dtlite.....	34
7.2.4 Проведение ПЦР-РВ на приборах QuantStudio5.	37
7.3 АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	40
7.3.1 Учет результатов анализа.....	43
7.4 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ.....	48
8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	49
8.1 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ НАБОРА	49
8.2 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ НАБОРА.....	49
8.3 СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА.....	49
8.4 ИНФОРМАЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ.....	50
8.5 ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	50
9. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	51

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

<i>LSDV</i>	<i>Lumpy Skin Disease Virus</i>
<i>SPPV</i>	<i>Sheeppox Virus</i>
<i>GTPV</i>	<i>Goatpox Virus</i>
ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в реальном времени
НК	- нуклеиновая кислота
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОКО-В	- отрицательный контрольный образец выделения
ВПК	- внутренний положительный контроль выделения ДНК
ТКО	- твердые коммунальные отходы
ПО	- программное обеспечение
ГЭ	- геном эквивалент

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* (вируса нодулярного дерматита *Lumpy skin disease virus*, вирусов оспы коз и овец *Sheeppox virus/Goatpox virus*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы».

1.2 Назначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» предназначен для качественного определения ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* и дифференциации вирусов нодулярного дерматита (*Lumpy skin disease virus - LSDV*), оспы овец и коз (*Sheeppox virus, Goatpox virus – SPPV/GTPV*) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и флуоресцентной детекции в препаратах ДНК, выделенных из проб, полученных при взятии биологического материала инфицированных, больных животных (содержание везикул и пустул, папулы и оспенные корки, фрагменты кожных покровов, цельной крови, мазков со слизистой носоглотки, ротоглотки и конъюнктивы, молока и патологического материала (селезенка, легкие, печень, почки, и др.).

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования для этиологической диагностики вирусных заболеваний нодулярного дерматита крупного рогатого скота, оспы овец и коз при исследовании материала от инфицированных (подозрительных на заболевание) животных.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – лабораторная диагностика в ветеринарии, научные исследования. Набор может быть использован в ветеринарных научно-исследовательских и научно-производственных учреждениях, ветеринарных лабораториях и станциях по борьбе с болезнями животных, других подразделениях и учреждениях ветеринарного и ветеринарно-санитарного профиля.

Набор реагентов не подлежит использованию в случаях:

- нарушения внутренней упаковки;
- отсутствия соответствия между описанием и внешним видом реагентов;
- несоблюдения условий транспортирования и хранения согласно инструкции;
- истечения срока годности.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Формы выпуска

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает набор реагентов для выделения ДНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и их аналогах «М-Сорб-Вет-ДНК», набор реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы».

Форма 2 включает набор реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы».

Форма выпуска 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом сорбции на магнитных частицах и амплификацию ДНК (ПЦР-РВ).

Форма выпуска 2 предназначена ТОЛЬКО для проведения амплификации ДНК (ПЦР-РВ). Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать набор реагентов для экстракции ДНК (например «М-Сорб-Вет-ДНК» или аналогичные наборы, предназначенные для выделения ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* из соответствующего биологического материала).

2.2 Состав набора

2.2.1 Набор реагентов для выделения ДНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher и их аналогах Flex System «М-Сорб-Вет-ДНК»

Набор предназначен для выделения ДНК ручным способом или на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах.

Набор рассчитан на 96 выделений, включая контрольные образцы.

Набор состоит из 5 реагентов.

№	Реагент	Объем	Кол-во
1.	Лизирующий раствор, ЛОР	60 мл	1 флакон
2.	Сорбирующий раствор, СР	5 мл	1 флакон
3.	Промывочный раствор, ПР	60 мл	2 флакона
4.	Элюирующий раствор, ЭР	13 мл	1 флакон
5.	Отрицательный контрольный образец выделения, ОКО-В	1 мл	1 пробирка

2.2.2 Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы»

Набор «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» предназначен для амплификации ДНК методом ПЦР-РВ с флуоресцентной детекцией.

Набор выпускается в формате полностью готовой концентрированной реакционной смеси, содержащей фермент и раскапанной в стрипованные микропробирки.

Набор рассчитан на 96 анализируемых проб (112 реакций, включая контрольные образцы).

Набор состоит из 4 реагентов.

№	Состав набора	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь в стрипованных микропробирках, РС АМПЛИ-ВЕТ-КАПРИПОКСВИРУСЫ	8x0,005 мл	14 стрипов по 8 микропробирок
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-Каприпоксвирусы	-	1 пробирка
3.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	1 мл	1 пробирка
4.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК	1 мл	1 пробирка

2.3 Метод исследования

2.3.1 Принцип метода выделения ДНК

Метод выделения ДНК с помощью набора реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» является многошаговым и сочетает освобождение ДНК из вирусной частицы, сорбцию ДНК на магнитных частицах и осаждение ДНК в присутствии осаждающего реагента. Комбинирование сорбентного и осаждающего методов выделения ДНК обеспечивает высокую эффективность выделения ДНК.

Проба образца обрабатывается лизирующим раствором, содержащим хаотропный агент, обеспечивая разрушение вирусной частицы и освобождение ДНК. Растворенная ДНК связывается с силиканизированными магнитными частицами в присутствии осаждающего реагента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции ДНК к магнитному сорбенту происходит переход ДНК с поверхности носителя в раствор, который затем освобождается от частиц сорбента магнитной силой.

В результате указанной процедуры получается препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Для определения наличия ингибиторов ПЦР и оценки эффективности выделения ДНК в состав набора входит внутренний положительный контроль выделения (в составе набора для проведения амплификации «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы»).

2.3.2 Принцип метода выявления ДНК каприпоксвирусов

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вирусов рода *Capripoxvirus*, а также дифференциации вирусов *LSDV* и *SPPV/GTPV* основано на использовании метода мультиплексной ПЦР-РВ.

При амплификации методом ПЦР-РВ в реакционной смеси используются два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих родоспецифичный фрагмент ДНК вирусов рода *Capripoxvirus*, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих видоспецифичные фрагменты ДНК вирусов *LSDV* и *SPPV/GTPV*, и два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также четыре флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени.

Набор реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси родоспецифичный фрагмент ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* – по каналу флуоресценции FAM/Green, видоспецифичный фрагмент ДНК вируса *LSDV* – по каналу флуоресценции R6G/HEX/VIC/Yellow, видоспецифичный фрагмент ДНК вирусов *SPPV/GTPV* – по каналу флуоресценции ROX/Orange, а также внутренний положительный контроль – по каналу флуоресценции Cy5.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит видоспецифичную ДНК соответствующего каприпоксвируса. Отрицательный результат теста означает, что в исследуемом материале не обнаружена видоспецифичная ДНК каприпоксвирусов.

2.4 Ограничения метода

В исследуемом материале видоспецифичные фрагменты ДНК вирусов нодулярного дерматита и оспы овец и коз могут быть не обнаружены по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ПЦР-РВ.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК либо на этапе проведения реакции ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики набора реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» – специфичность, чувствительность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) – установлены в ходе валидации набора реагентов.

3.1 Чувствительность

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет не более $5,0 \times 10^2$ копий ДНК (ГЭ) в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹) с воспроизводимостью не менее 95 %.

Оценка аналитической чувствительности набора реагентов проведена с использованием различных видов биоматериала (кровь, образцы тканей и др.).

Ингибирующего влияния эндогенных (гемоглобин 200 мкг/мл, муцин 5%) потенциально интерферирующих веществ на результат ПЦР при исследовании образцов набором «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» не выявлено.

3.2 Специфичность

Аналитическая специфичность анализа – 100%.

Оценка специфичности набора реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы», проводимая *in silico* с использованием имеющейся на текущий момент геномной информации, проводилась с учетом требуемой специфичности каждой из реакций, входящих в мультиплексную ПЦР-систему. В связи с этим анализ проводили для каждого из амплифицируемых фрагментов отдельно, а затем оценивали вероятность ложноотрицательного и ложноположительного результата в целом. Для оценки специфичности фрагмента, выявляющего каприпоксвирусы в целом, всего было изучено 257 геномов представителей рода *Capripoxvirus*, содержащихся в базе данных NCBI. Процент гомологии амплифицируемого фрагмента в целом среди представителей рода *Capripoxvirus* составил более 98,5%. Вероятность ложноотрицательного результата внутри рода *Capripoxvirus* составила 0%. Для оценки специфичности каждого из амплифицируемых фрагментов вирусов *LSDV* и *SPPV/GTPV* было изучено 97 геномов, имеющих в базе данных NCBI. Вероятность ложноотрицательного результата внутри видов *LSDV* и *SPPV/GTPV*, а также вероятность ложноположительного перекрестного результата среди представителей видов рода *Capripoxvirus* составила 0%. Для оценки вероятности ложноположительного результата для всех 3-х амплифицируемых фрагментов в мультиплексной ПЦР-системе (фрагмент, специфичный для рода *Capripoxvirus* и два фрагмента, видоспецифичные в отношении организмов *LSDV* и *SPPV/GTPV* соответственно) было проведено два поиска: среди представителей семейства *Poxviridae*, исключая род *Capripoxvirus*; среди геномов иных организмов (схожих по таксономии) исключая род *Capripoxvirus*. Процент максимальной гомологии в первом исследовании не превышал 80% для всех амплифицируемых в ПЦР-системе фрагментов, а во втором исследовании –

37% для фрагмента, специфичного для рода *Capripoxvirus*, и 0% для обоих фрагментов, видоспецифичных в отношении вирусов *LSDV* и *SPPV/GTPV*. Таким образом, вероятность ложноположительного результата среди представителей семейства *Poxviridae*, а также вероятность ложноположительного результата среди иных организмов составила 0% для набора «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» в целом.

Оценку специфичности *in vitro* проводили на следующих образцах ДНК каприпоксвирусов из коллекции ФКП «Армавирская биофабрика» (таблица 1):

Таблица 1 – Штаммы каприпоксвирусов из коллекции ФКП «Армавирская биофабрика»

№ п/п	Вид	Штамм
1	Вирус нодулярного дерматита (<i>Lampry Skin Disease</i>)	АБФ 16-1
2	Вирус оспы овец	КМИЭВ М-140
3	Вирус оспы овец	Монгольский
4	Вирус оспы овец	RM-65
5	Вирус оспы овец	«ВНИИЗЖ»
6	Секционный материал "Нодулярный дерматит"	

Отсутствие специфических реакций *in vitro* проводили на следующих образцах ДНК гетерологичных микроорганизмов из коллекции ФКП «Армавирская биофабрика» (таблица 2):

Таблица 2 – Штаммы гетерологичных микроорганизмов из коллекции ФКП «Армавирская биофабрика»

№ п/п	Вид	Номер/название штамма
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	415
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (<i>Aspergillus niger</i>)	F-879
	<i>Bacillus cereus</i>	10702 ATCC = 8035 NCTC = 9122 NCIR
	<i>Bacillus subtilis</i>	№6633
	<i>Candida albicans</i>	Y-3108
	<i>Clostridium chauvoei</i>	R ₁₅
	<i>Clostridium novyi</i>	198
	<i>Clostridium oedematiens</i> (<i>novyi</i>)	№34
	<i>Clostridium perfringens</i> t. D	№ 213
	<i>Clostridium perfringens</i> t. C.	№ 3
	<i>Clostridium septicum</i>	1098
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1404
	<i>Escherichia coli</i> ATCC (F-50)	№25922
	<i>Pasteurella multocida</i>	1231
	<i>Pasteurella multocida</i>	656
	<i>Pasteurella multocida</i>	T-80
	<i>Pasteurella multocida</i>	8683
	<i>Pasteurella multocida</i>	796
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC №9027 = CCM №1961
	<i>Salmonella abortus ovis</i>	372
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	370
	<i>Salmonella dublin</i>	373
	<i>Salmonella typhimurium</i>	371
	<i>Staphylococcus aureus</i>	№6538-P ATCC = №209-P FDA
	<i>Streptococcus fecalis</i>	13
	<i>Streptococcus fecalis</i>	345
	<i>Streptococcus fecalis</i>	356
	<i>Streptococcus fecalis</i>	«Константиновский»
	<i>Streptococcus fecalis</i>	«Соколово»
	Вирус парагриппа 3 КРС	BC-05
	Инфекционный ринотрахеит КРС	«Т»

а также на ДНК человека (*Homo sapiens*), свиньи (*Sus scrofa*), КРС (*Bovinae*), овцы (*Ovis aries*), козы (*Capra hircus*), собаки (*Canis lupus*), кошки (*Felis Catus*).

Ложноотрицательные и ложноположительные результаты при анализе образцов отсутствовали.

3.3 Повторяемость и воспроизводимость

В ходе валидации набора реагентов в различных сочетаниях форм выпуска, автоматического и ручного выделения НК, пяти видов амплификаторов, мест и времени анализа, а также различными операторами, была проведена оценка прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости. Повторяемость и воспроизводимость определения ДНК каприпоксвирусов были установлены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой реагент ПКО и СКО, содержащий ДНК *LSDV* и *SPPV* в концентрации $1 \cdot 10^3$ копий·мл⁻¹, в качестве отрицательных образцов были использованы реагенты ОКО и ОКО-В.

Под повторяемостью понимали степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же комплекта оборудования в пределах короткого промежутка времени. Под воспроизводимостью понимали степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, с использованием различных комплектов оборудования, разных серий наборов реагентов.

Внутрипостановочная повторяемость результатов исследования контрольных образцов на выявление ДНК каприпоксвирусов набором реагентов во всех формах выпуска на пяти видах амплификаторов составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 10-ти повторов каждого образца не более 1,83% (для двух серий). Межсерийная воспроизводимость результатов исследования контрольных образцов на выявление ДНК каприпоксвирусов набором реагентов во всех формах выпуска на пяти видах амплификаторов составила 100% с коэффициентом вариации пороговых циклов амплификации 5-ти повторов каждого образца не более 1,86%.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения

работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав набора»). Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшего подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

При работе с набором рекомендовано соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности». Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

— Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса;

— Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%;

— Удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиНом 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»;

— Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке;

— Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР-РВ с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах. Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;

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

пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

— Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 15-30 мин;

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

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

— 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;

— Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. Вреден при проглатывании. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

В состав компонентов набора «РС Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» входят следующие материалы животного происхождения – БСА и рекомбинантная Таq-полимераза, являющиеся биологически безопасными.

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при

использовании или реализации, поскольку входящие в состав изделия вещества (Тақ-полимераза и БСА) являются биологически безопасными.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным. Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- канцерогенный эффект отсутствует;
- мутагенное действие отсутствует;
- репродуктивная токсичность отсутствует.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Прибор для ПЦР-РВ —имеющий каналы детекции, соответствующие красителям FAM, ROX, R6G, Cy5 (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.погл.}}/\lambda_{\text{макс.флуорес.}}$: FAM – 490 нм/520 нм; ROX – 580 нм/610 нм; R6G – 520 нм/550 нм; Cy5 – 645 нм/670 нм), например, «АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург), CFX-96 (Bio-Rad, США), RotorGene (Qiagen, Германия), DTprime, DTlite (ДНК-Технология, Россия), QuantStudio5 (Thermofisher, США).

Для проведения ПЦР-РВ и оценки её результатов используют специализированное программное обеспечение (ПО), поставляемое производителем прибора:

- программа АНК_Shell версия 100 и выше, поставляемая с приборами «АНК-32М»;
- Bio-Rad CFX Manager 3.1 и выше, поставляемая с прибором CFX-96;
- QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3 и выше, поставляемая с прибором QuantStudio 5;
- RealTime_PCR v7.9.5.38 и выше, поставляемая с прибором DT;
- Rotor-Gene Q Series Software и выше, поставляемая с прибором Rotor-Gene.

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором «М-Сорб-Вет-ДНК» (для выделения ДНК) следует проводить в шкафу биологической безопасности (ШББ) не ниже 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

Набор реагентов для выделения ДНК «М-Сорб-Вет-ДНК» может быть использован в автоматизированных станциях KingFisher Flex System (Thermofisher, США) или их аналогах. Автоматизированные станции для выделения ДНК должны быть установлены в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09). Актуальный протокол выделения набором «М-Сорб-Вет-ДНК» предоставляется по запросу.

Работу с набором «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» (для проведения ПЦР-РВ) следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 0,5-10 мкл или 2-20 мкл, 20-200 мкл и на 100-1000 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

5.4.1 Для выделения ДНК ручным методом

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100 °С (например, «Циклотемп-303»);

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5425);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);

отсасыватель медицинский (например, ОМ-1);

штативы для наконечников и микропробирок объемом 1,5 и 2 мл;

магнитный штатив (например М-24, кат. номер СТ-16, ООО Синтол);

5.4.2 Для постановки ПЦР-РВ

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

микроцентрифуга для стрипов (например, «Циклотемп-903»);

штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;

штатив для работы со стрипами (кат. номер СТ-15, ООО Синтол);

холодильник/морозильник на 2-8 °С/минус 16-20 °С.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

5.6.1 Для выделения ДНК ручным методом

Микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл; до 200 мкл; до 10 или 20 мкл;

одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

5.6.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях

Одноразовые насадки на магнитные стержни для магнитной сепарации для системы KingFisher Flex;

одноразовые планшеты 96-луночные глубокие для системы KingFisher Flex;

одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл; до 200 мкл; до 10 или 20 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места и автоматизированной станции.

5.6.3 Для постановки ПЦР-РВ

Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл; до 20 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследования служат клинический материал от латентно инфицированных и больных животных: содержание везикул, пустул; папулы и оспенные корки; фрагменты кожных покровов; пробы цельной крови; мазков со слизистой носоглотки, ротоглотки и конъюнктивы, молоко и патологического материала (селезенка, легкие, печень, почки, и др.), патологический материал (селезенка, легкие, печень, почки, и др.).

При отборе образцов материала, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу. Материал от каждого животного отбирают отдельными инструментами.

6.2 Процедура получения биологического материала

Кровь для исследования отбирают в объеме 3-5 мл в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1. Желательно использовать одноразовые системы взятия крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Мазки со слизистой носоглотки, ротоглотки, конъюнктивы, содержимое везикул, пустул, папулы получают с помощью стерильного зонда, который вместе с материалом помещают в пробирку типа «Эппендорф» с 500 мкл 0,9% раствора натрия хлорида.

Фрагменты тканей и органов (оспенные корки, кожные покровы, селезенка, легкие, печень, почки, и др.) помещают в стерильный контейнер.

Молоко отбирают в стерильный контейнер.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Выделение ДНК проводят с помощью набора для экстракции ДНК «М-Сорб-Вет-ДНК» ручным методом или на автоматизированных станциях KingFisher Flex или их аналогах. Для достижения необходимой чувствительности аликвота исходного материала (пробы) должна быть объемом не менее 100 мкл.

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательные контроли выделения (ОКО-В), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения НК.

Для контроля выделения нуклеиновых кислот используют внутренний положительный контроль выделения (ВПК). Регистрация роста сигнала по каналу **Cy5/Red** свидетельствует об успешном выделении ДНК.

6.4 Подготовка анализируемого материала

Кровь, мазки со слизистой носоглотки, ротоглотки, конъюнктивы, содержимое везикул, пустул, папулы не требуют предварительной подготовки.

Пробы тканей и органов растирают в стерильной ступке с добавлением 0,9% раствора натрия хлорида в соотношении 1:5 (1:10). Надосадочную жидкость (0,1 – 0,2 мл) отбирают с помощью дозатора с аэрозольным фильтром через ватный тампон в отдельную пробирку объемом 1,5 – 2,0 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками. Центрифугируют в течение 5 мин при 12 000 об/мин. Удаляют надосадочную жидкость. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствор натрия хлорида и используют в анализе.

Молоко перемешивают, осаждают капли и в объеме 1,0 мл переносят в пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируют при 7000-10 000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант удаляют, оставив 100-200 мкл образца, не задевая осадок. Полученный образец используют для выделения нуклеиновых кислот.

6.5 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование материала в лабораторию и его хранение до проведения исследований проводят в соответствии с ГОСТ 31719-2012, ГОСТ Р 51447-99, ГОСТ 8756.0-70 и требованиями методических рекомендаций «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», (таблица 3).

Таблица 3 – Условия транспортирования и хранения биоматериала.

Тип образца	Требования к сбору материала	Транспортировка	Условия хранения до тестирования	Комментарии
Кровь	Пробирки с 3% раствором ЭДТА	2-8 °С	≤ 72 часа: 2-8 °С	Не допускается замораживание материала
Ткани, органы	Стерильный контейнер	2-8 °С	≤ 24 часов: 2-8 °С ≤ 90 дней: -24 до -16 °С > 90 дней ^{<*>} : -70°С	Допускается однократное замораживание-оттаивание материала
Молоко	Стерильный контейнер	2-8 °С	≤ 72 часа: 2-8 °С; ≤ 7 суток: -20 °С; > 90 дней ^{<*>} : -68°С	Допускается однократное замораживание-оттаивание материала
Мазки	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков ^{<***>}	18-25 °С	≤ 48 часов: 18-25°С; ≤ 7 суток: 2-8 °С > 90 дней: -70 до -16°С	Допускается однократное замораживание-оттаивание материала

* при невозможности обеспечить хранение при минус 70 С образцы хранить при минус 20 С;

** для транспортировки образцов используют ТС (транспортную среду), содержащую противогрибковые и антибиотиковые добавки.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК набором «М-Сорб-Вет-ДНК»

Процедуру выделения ДНК с помощью набора «М-Сорб-Вет-ДНК» проводят ручным методом или на автоматизированных станциях в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Для определения наличия ингибиторов ПЦР-РВ и оценки эффективности выделения ДНК в состав набора (для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы») входит внутренний положительный контроль выделения (ВПК).

7.1.1 Проведение выделения ДНК ручным методом

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательные контроли выделения (ОКО-В) (1 на 10-24 исследуемых образцов, который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! Если при выполнении какой-либо операции во время выделения ДНК произошла «авария» (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца попали на рабочую

поверхность и т.д.), необходимо сменить перчатки и провести деконтаминационные работы!

I. Лизис

— Маркируют необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл в соответствии с планом исследования. Пробирки с ОКО-В расставляют в соответствии с маркировкой между образцами (1 на 10-20 исследуемых образцов).

— Вносят в пробирки по 600 мкл лизирующего раствора ЛОР, и по 10 мкл ВПК¹, входящий в состав набора для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы»;

ВНИМАНИЕ! ВПК из набора для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы» может храниться при температуре от минус 20 до плюс 25°C.

— Флакон с сорбирующим раствором СР тщательно перемешивают и вносят в пробирки по 40 мкл СР;

ВНИМАНИЕ! При использовании набора в полном объеме в однократном выделении можно во флакон с лизирующим раствором ЛОР добавить весь объем внутреннего положительного контроля выделения ВПК и сорбирующего раствора СР. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в подготовленные пробирки по 650 мкл рабочего раствора.

— В каждую пробирку ОКО-В вносят по 100 мкл ОКО-В из набора;

— Вносят по 100 мкл исследуемой пробы в подготовленные пробирки, за исключением пробирок с ОКО-В.

— Содержимое пробирок тщательно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугируют для сброса капель и помещают в термостат;

Меняют перчатки на новые!

— Образцы выдерживают в термостате при температуре 65 °С в течение 9 минут, периодически перемешивая;

— Вынимают пробирки из термостата, охлаждают при комнатной температуре.

II. Сорбция и осаждение ДНК

— Устанавливают пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугируют в течение 1 мин. при 10 000 об/мин;

— Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;

¹ При использовании набора для амплификации другого производителя необходимо использовать внутренний контроль соответствующего производителя

ВНИМАНИЕ! Надосадочную жидкость необходимо отбирать **ПОЛНОСТЬЮ** во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!

— Вынимают пробирки из магнитного штатива и переставляют в обычные лунки.

III. Промывка ДНК

— Добавляют в пробирки 600 мкл промывочного раствора ПР, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;

— Устанавливают пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугируют в течение 1 мин. при 10 000 об/мин;

— Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;

— Добавляют в пробирки 600 мкл промывочного раствора ПР, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;

— Устанавливают пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугируют в течение 1 мин. при 10 000 об/мин;

— Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;

— Устанавливают пробирки с открытыми крышками в термостат;

Меняют перчатки на новые!

— Выдерживают пробирки с образцами с открытыми крышками в термостате в течение 9 мин. при температуре 65°C для удаления остатков промывочного раствора ПР;

IV. Десорбция ДНК

— Готовят чистые 1,5 мл пробирки для следующего этапа (десорбции ДНК). Маркируют.

— Добавляют в пробирки с сорбентом 120 мкл элюирующего раствора ЭР, закрывают крышки и перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;

— Центрифугируют пробирки кратковременно для сброса капель и устанавливают в термостат;

— Выдерживают пробирки в термостате в течение 9 мин. при температуре 65°C, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе;

— Устанавливают пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с

одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугируют в течение **1 мин.** при **10 000 об/мин**;

- Устанавливают пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин;
- Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, переносят **100 мкл** раствора ДНК в чистые пробирки в соответствии с маркировкой.

ВНИМАНИЕ! Если некоторое количество магнитного сорбента было перенесено вместе с раствором ДНК, перед постановкой ПЦР-РВ необходимо установить пробирки с образцами в магнитный штатив и производить забор образца, не вынимая пробирки из магнитного штатива.

7.1.2 Выделение ДНК на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и их аналогах.

Для выделения ДНК набором «М-Сорб-Вет-ДНК» с помощью роботизированной станции KingFisher Flex System и ее аналогах:

- Включают управляющий компьютер и саму станцию.
- Подготавливают 4 планшета и 1 гребёнку;
- Вносят последовательно в лунки рабочего планшета 1 по **600 мкл** лизирующего раствора ЛОР, по **10 мкл** ВПК (входит в состав набора для проведения ПЦР-РВ), по **40 мкл** сорбирующего раствора СР;

ВНИМАНИЕ! При использовании набора в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором ЛОР добавить весь объем внутреннего положительного контроля выделения ВПК и сорбирующего раствора СР. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в лунки рабочего планшета 1 по **650 мкл** рабочего раствора.

ВНИМАНИЕ! Для внесения рабочих растворов в планшеты можно использовать многоканальные дозаторы для оптимизации процесса и сокращения времени подготовки к выделению.

- Вносят в лунки планшетов 2 и 3 по **600 мкл** промывочного раствора ПР;
- Вносят в лунки планшета 4 по **120 мкл** элюирующего раствора ЭР;

Вносят в лунки подготовленного планшета 1 по **100 мкл** образцов (включая **ОКО-В**, 1 на 10-20 исследуемых образцов). Минимальное количество ОКО-В для выделения 48 образцов – 2, для 96 образцов – 3.

Рекомендуемое расположение ОКО-В на плашке для выделения 48 образцов:

	1	2	3	4	5	6
A						
B	ОКО-В					
C						
D			ОКО-В			
E						
F					ОКО-В	
G						
H						

Рекомендуемое расположение ОКО-В на плашке для 96 образцов (включая ОКО-В):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	ОКО-В							ОКО-В				
C												
D			ОКО-В							ОКО-В		
E												
F					ОКО-В							ОКО-В
G												
H							ОКО-В					

— Запускают протокол и далее следуют инструкциям протокола.

ВНИМАНИЕ! Достижение указанных в инструкции характеристик набора (чувствительность, эффективность выделения, отсутствие ингибирования и контаминации) гарантируются **ТОЛЬКО** при использовании валидированного протокола выделения на соответствующей станции от производителя набора реагентов «М-Сорб-Вет-ДНК». Актуальный протокол выделения набором «М-Сорб-Вет-ДНК» предоставляется по запросу.

7.1.3 Условия хранения анализируемых проб (образцов ДНК)

Раствор ДНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

7.2 Проведение ПЦР-РВ набором реагентов «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы»

ПЦР-РВ проводят в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free». Наконечники использовать только с аэрозольным барьером.

7.2.1 Подготовка к проведению ПЦР-РВ

— Отбирают необходимое количество стрипованных пробирок с концентрированной реакционной смесью **АМПЛИ-ВЕТ-КАПРИПОКСВИРУСЫ** для амплификации образцов в количестве равном N+2, где N - количество исследуемых образцов и 2 - контрольные образцы (ПКО и ОКО).

— Пробирки с реакционной смесью, после размораживания, центрифугируют 5-10 секунд на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл для сброса капель;

— Раствор для разбавления ПКО, ОКО выдерживают 15 минут при комнатной температуре, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугируют в течение нескольких секунд для сброса капель;

— В пробирку с сухим содержимым ПКО-Каприпоксвирусы добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹. Хранение разведенных препаратов ПКО-Каприпоксвирусы допускается при температуре не выше минус 16°С в течение срока годности;

— Помещают стрипованные пробирки с реакционной смесью в штатив. Маркируют пробирки в соответствии с протоколом исследования. Для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку необходимо наносить на стенку пробирки (CFX, АНК, DT, QS); для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку (RotorGene).

— Исследуемые и контрольные образцы размораживают, перемешивают на встряхивателе и центрифугируют;

— Вносят в пробирки (на стенку пробирки) по 20 мкл ПКО, ОКО, исследуемых образцов в соответствии с маркировкой, используя наконечники с аэрозольным барьером.

— Содержимое стрипованных пробирок тщательно перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе (до полного растворения реакционной смеси) и центрифугируют 2 мин при 3000 об·мин⁻¹ на микроцентрифуге с использованием ротора для стрипованных пробирок 0,2 мл.

ВНИМАНИЕ! После смешивания реакционной смеси и препарата ДНК, в течение 30 мин. при температуре +2-8°С, микропробирки необходимо установить в амплификатор и запустить ПЦР-РВ.

— Помещают микропробирки в прибор в соответствии с протоколом исследования и прикатывают крышки микропробирок;

— Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации;

— Вводят параметры температурно-временного режима амплификации согласно таблице 4 и вводят красители FAM(Green), R6G (HEX, Yellow/VIC), ROX (Orange) и Cy5 (Red). Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Green – 4, Yellow – 5, Orange – 5, Red – 5;

Таблица 4 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим (CFX, АНК, DT, QS)	Температурно-временной режим (RotorGene)	Количество циклов
1	95 °С – 300 секунд	94 °С – 300 секунд	1
2	95 °С – 15 секунд	94 °С – 15 секунд	
3	60 °С – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции (FAM, HEX, ROX, Cy5)	59 °С – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции (Green, Yellow, Orange, Red)	45

— Вводят сведения об образцах по всем красителям и активируют прибор в соответствии с руководством по эксплуатации;

— Закрывают крышку прибора, запускают реакцию ПЦР-РВ и фиксируют в рабочем журнале название файла с результатом работы прибора, расчетное время анализа составляет в среднем 1,5 часа.

7.2.2 Проведение ПЦР-РВ на приборах RotorGene6000/RotorGeneQ

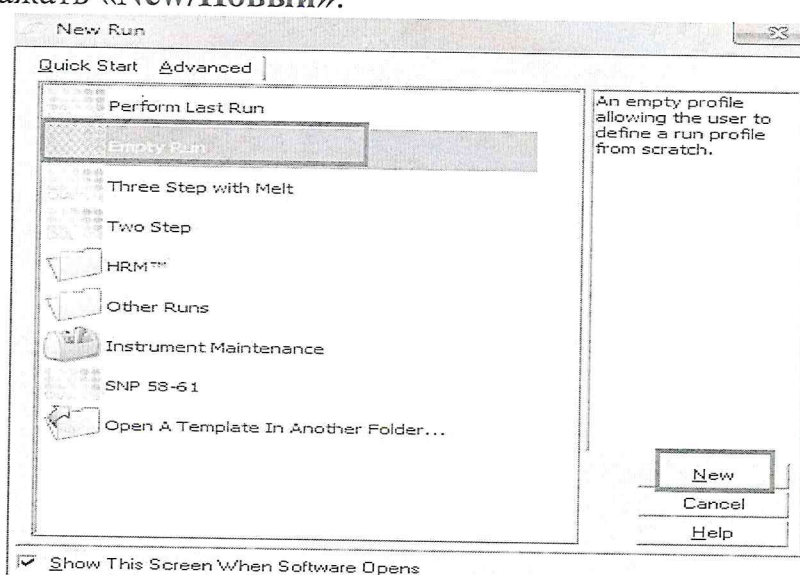
1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Запустить программу «Rotor-Gene».

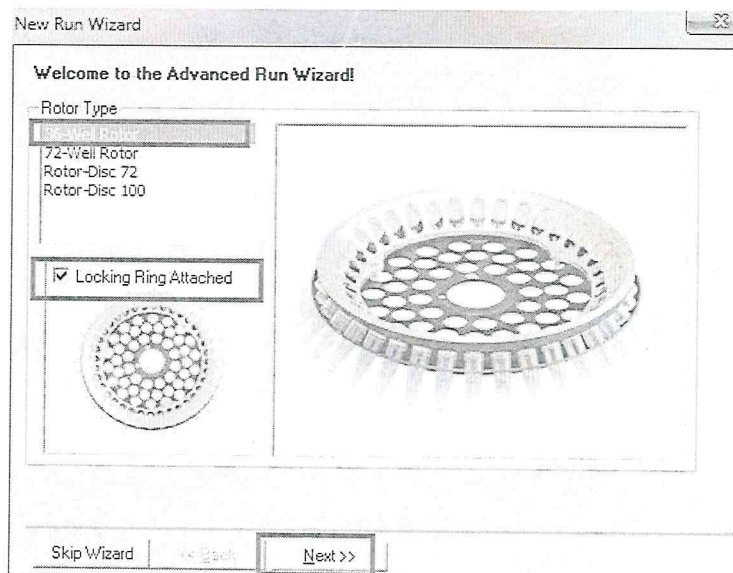
3. В окне «New Run/Новый тест» выбрать вкладку «Quick Start/Быстрый старт» и выбрать шаблон «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы».

3.1 *Создание шаблона «Ампли-Вет-Каприпоксвирусы»*

3.1.1 В окне «New Run/Новый тест» выбрать вкладку «Advanced/Детальный мастер», затем опцию «Empty Run/Пустой шаблон» и нажать «New/Новый».

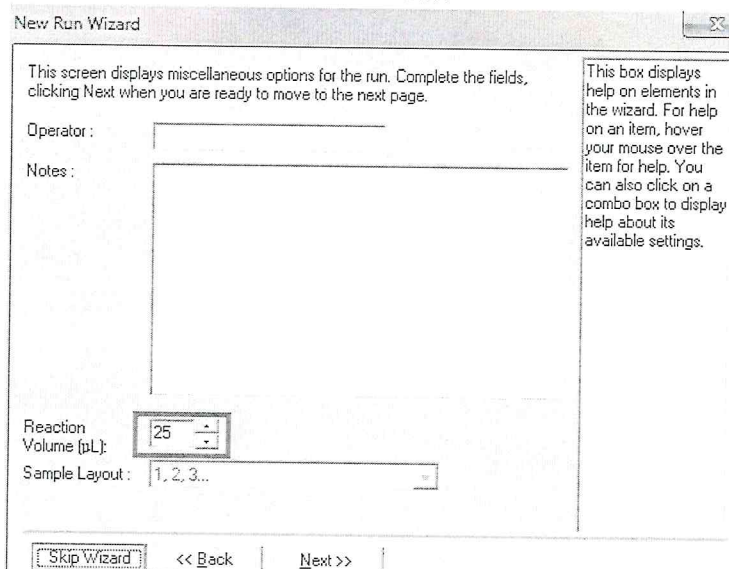


3.1.2 В открывшемся окне выбрать тип ротора «36-Well Rotor/36-луночный ротор» и поставить галочку в окне «Locking Ring Attached/Кольцо закреплено», нажать «Next/Далее».



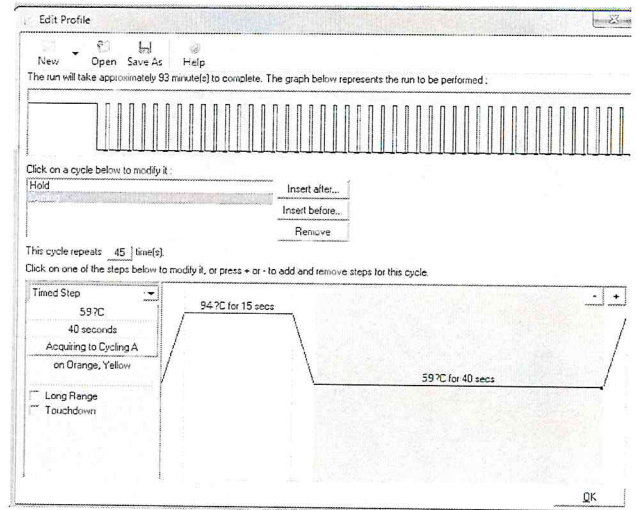
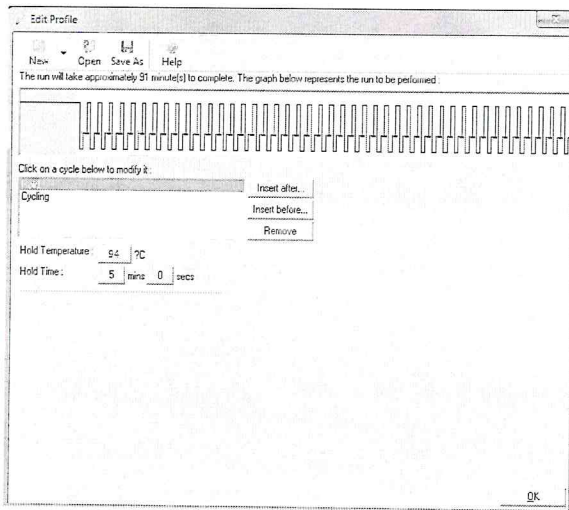
3.1.3 В открывшемся окне установить «Reaction Volume/Объем реакции» 25 мкл и нажать «Next/Далее».

Примечание В ранних версиях программы необходимо убрать галочку «15 μ L oil layer volume/Объем масла/воска».



3.1.4 открывшемся окне нажать кнопку «Edit Profile/Редактор профиля», нажать «New/Новый» и выбрать «Cycling (default)/Циклирование (по умолч.)». Задать программу амплификации со следующими параметрами:

Шаг	Темп., °C	Время	Детекция	Красители	Повторов
Hold	94	5 mins	No acquiring		1
Cycling	94	15 secs	No acquiring		45
	59	40 secs	Acquiring	Green, Yellow, Orange, Red	



3.1.5 В окне «Edit Profile/Редактор профиля» нажать кнопку «ОК».

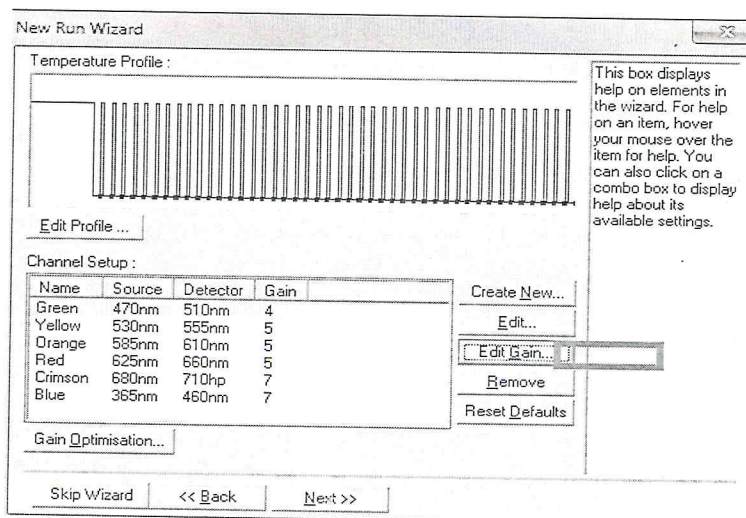
3.1.6 Установить чувствительность прибора в области настроек «Chanel Setup/Установка канала», используя клавишу «Edit Gain/Уровень сигнала»:

Green – 4

Yellow – 5

Orange – 5

Red – 5



3.1.7 Нажать клавишу «Next/Далее».

3.1.8 Сохранить шаблон нажав «Save Template/Сохранить шаблон».

Необходимо сохранять шаблон в папку с программным обеспечением прибора, например, *C:\Program Files (x86)\Rotor-Gene 6000 Software\Templates\Quick Start Templates*