

ФКП «Армавирская биофабрика»

REF

VD-005-23



АМПЛИ-ВЕТ-КЧС

Набор реагентов для выявления РНК вируса классической чумы свиней (*Classical Swine Fever Virus*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

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

ROX, R6G, Cy5



112

LOT

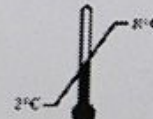
010423



2024-04



2023-04



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. Сусский

« _____ » _____ 2023 г



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса
классической чумы свиней (*Classical Swine Fever Virus*) методом
полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

«Ампли-Вет-КЧС»

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
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 Состав набора.....	6
2.2.1 Набор реагентов для выделения РНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher и их аналогах Flex System «М- Сорб-Вет-РНК»	6
2.2.2 Набор реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ «Ампли-Вет-КЧС»	7
2.3 Метод исследования	7
2.3.1 Принцип метода выделения РНК.....	7
2.3.2 Принцип метода выявления РНК вируса CSFV	8
2.4 Ограничения метода.....	9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
3.1.1 Чувствительность.....	9
3.1.2 Специфичность	10
3.1.3 Повторяемость и воспроизводимость	11
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	12
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	16
5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование.....	16
5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования.....	17
5.3 Дозирующие устройства	17
5.4 Другое используемое оборудование	17
5.4.1 Для выделения РНК ручным методом.....	17
5.4.2 Для выделения РНК на автоматизированных станциях	18
5.4.3 Для постановки ОТ-ПЦР-РВ	18
5.5 Лабораторная посуда.....	18
5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора	18
5.6.1 Для выделения РНК ручным методом.....	18
5.6.2 Для выделения РНК на автоматизированных станциях	18
5.6.3 Для постановки ОТ-ПЦР-РВ	19
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ	19

6.1 Тип исследуемых образцов	19
6.2 Процедура получения биологического материала	19
6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала	20
6.4 Подготовка анализируемого материала	20
6.5 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов	20
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	21
7.1 Выделение РНК набором «М-СОРБ-ВЕТ-РНК»	21
7.1.1 Проведение выделения РНК ручным методом.....	22
7.1.2 Выделение РНК на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и их аналогах.	25
7.1.3 Условия хранения анализируемых проб (образцов РНК)	27
7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР-РВ НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ «АМПЛИ-ВЕТ-КЧС»	27
7.2.1 Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ.....	27
7.2.2 Проведение ОТ-ПЦР-РВ на приборах RotorGene6000/RotorGeneQ .	29
7.2.3 Проведение ОТ-ПЦР-РВ на приборах CFX96	33
7.2.3 Проведение ОТ-ПЦР-РВ на приборах АНК-32 (32М, 48).....	36
7.2.3. Проведение ОТ-ПЦР-РВ на приборах Dprime / Dtlite.	41
7.2.4 Проведение ОТ-ПЦР-РВ на приборах QuantStudio5.	45
7.3 АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	48
7.3.1 Учет результатов анализа	50
7.4 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ.....	56
8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	57
8.1 Условия хранения набора	57
8.2 Условия транспортирования набора.....	57
8.3 Условия эксплуатации и срок годности набора	57
8.4 ИНФОРМАЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ.....	58
8.5 ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	58
9. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	60

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

CSFV	<i>Classical Swine Fever Virus</i>
КЧС	Классическая Чума Свиней
ОТ-ПЦР-РВ	- обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной цепной реакцией в реальном времени
НК	- нуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ПКО	- положительный контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОКО-В	- отрицательный контрольный образец выделения
ВПК	- внутренний положительный контроль выделения
ТКО	- твердые коммунальные отходы
ПО	- программное обеспечение
ШББ	- шкаф биологической безопасности
ГЭ	- геном эквивалент

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для выявления РНК вируса классической чумы свиней (*Classical Swine Fever Virus*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) «Ампли-Вет-КЧС».

1.2 Назначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Ампли-Вет-КЧС» предназначен для качественного определения РНК вируса классической чумы свиней (*Classical Swine Fever Virus – CSFV*) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) и флуоресцентной детекцией в препаратах РНК, выделенных из проб, полученных при взятии клинического материала инфицированных, больных животных (цельной крови, мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки), патологического материала (миндалины, селезенка, легкие, печень, лимфоузлы и др.), продуктов свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и изделий

свиного происхождения (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.). Набор позволяет дифференцировать дикий и вакцинный штаммы *CSFV*.

Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования для этиологической диагностики вирусного заболевания классической чумы свиней (КЧС) при исследовании материала от инфицированного либо подозрительного на заболевание животного.

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-КЧС» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Формы выпуска

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает набор реагентов для выделения РНК ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System и их

аналогах «М-Сорб-Вет-РНК», набор реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ анализа «Ампли-Вет-КЧС».

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

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

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

2.2 Состав набора

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

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

Набор рассчитан на 96 выделений, включая контрольные образцы.

Набор состоит из 7 реагентов.

№	Реагент	Объем	Кол-во
1.	Лизирующий раствор, ЛОР	60 мл	1 флакон
2.	Сорбирующий раствор, СР	6 мл	1 флакон
3.	Промывочный раствор А, ПР-А	60 мл	1 флакон
4.	Промывочный раствор В, ПР-В	60 мл	1 флакон
5.	Промывочный раствор С, ПР-С	60 мл	1 флакон
6.	Элюирующий раствор, ЭР	13 мл	1 флакон
7.	Отрицательный контрольный образец выделения, ОКО-В	1 мл	1 пробирка

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

Набор «Ампли-Вет-КЧС» предназначен для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации методом полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с флуоресцентной детекцией.

Набор выпускается в формате лиофилизированной реакционной смеси, содержащей фермент и раскапанной в стрипованные микропробирки.

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

Набор состоит из 5 реагентов.

№	Состав набора	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, РС АМПЛИ-ВЕТ-КЧС	-	14 стрипов по 8 микропробирок
2.	Разбавитель, РБ	1 мл	2 пробирки
3.	Положительный контрольный образец, ПКО-КЧС	-	2 пробирки
4.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	1 мл	2 пробирки
5.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-РНК	1 мл	1 пробирка

2.3 Метод исследования

2.3.1 Принцип метода выделения РНК

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

Проба образца обрабатывается лизирующим раствором, содержащим хаотропный агент, обеспечивая разрушение вирусной частицы и освобождение РНК. Растворенная РНК 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 РНК к магнитному сорбенту происходит переход РНК с поверхности носителя в раствор, который затем освобождается от частиц сорбента магнитной силой.

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

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

2.3.2 Принцип метода выявления РНК вируса *CSFV*.

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вируса КЧС основано на использовании метода одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) в одной микропробирке.

При амплификации методом ОТ-ПЦР-РВ в реакционной смеси используются два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих видоспецифический фрагмент РНК вируса *CSFV*, два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих видоспецифический фрагмент РНК вакцинного штамма вируса *CSFV* и два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих РНК внутреннего положительного контроля ОТ-ПЦР-РВ, а также три флуоресцентных зонда. Процесс амплификации специфичных фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации РНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров РНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени.

Набор реагентов «Ампли-Вет-КЧС» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси видоспецифичный фрагмент РНК вируса *CSFV* – по каналу флуоресценции **ROX/Orange**, видоспецифичный фрагмент РНК вакцинного штамма вируса *CSFV* – по каналу флуоресценции

R6G/HEX/VIC/Yelloy, а также внутренний положительный контроль – по каналу флуоресценции **Cy5/Red**.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит видоспецифичную РНК дикого или вакцинного штамма вируса *CSFV*. Отрицательный результат теста означает, что в исследуемом материале не обнаружена видоспецифичная РНК вируса *CSFV*.

2.4 Ограничения метода

В исследуемом материале видоспецифичные фрагменты РНК вируса КЧС могут быть не обнаружены по причине ингибирования ОТ-ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения РНК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ОТ-ПЦР-РВ.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитические характеристики «Набора реагентов для выявления РНК вируса классической чумы свиней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Ампли-Вет-КЧС)» – специфичность, чувствительность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) – установлены в ходе валидации набора реагентов.

3.1.1 Чувствительность

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет не более 1×10^3 копий РНК в миллилитре пробы (копий·мл⁻¹) с воспроизводимостью не менее 95 %.

Оценка аналитической чувствительности набора реагентов проведена для 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-КЧС» не выявлено.

3.1.2 Специфичность

Аналитическая специфичность анализа – 100%.

Специфичность набора исследована при анализе образцов РНК *CSFV* штамма «Амурский 2019» и др.

Отсутствие специфических реакций исследовали на следующих образцах НК гетерологичных микроорганизмов:

№ п/п	Вид	Номер/название штамма
1	<i>African Swine Fever Virus</i>	Татарстан/Сосновка/2016
2	<i>African Swine Fever Virus</i>	Коломна-Песково/2016
3	<i>African Swine Fever Virus</i>	Омск-2017
4	<i>African Swine Fever Virus</i>	Иркутск-2017
5	<i>African Swine Fever Virus</i>	Волгоград-Елань/2016
6	<i>African Swine Fever Virus</i>	Псков-Яшиково/2016
7	<i>African Swine Fever Virus</i>	Краснодар/Г.-Ключ 2019
8	<i>African Swine Fever Virus</i>	G-2018
9	<i>Pasteurella multocida</i>	1231
10	<i>Pasteurella multocida</i>	8683
11	<i>Pasteurella multocida</i>	656
12	<i>Pasteurella multocida</i>	796
13	<i>Pasteurella multocida</i>	T-80
14	<i>Clostridium oedematiens (novyi)</i>	№34
15	<i>Alcaligenes faecalis</i>	415
16	<i>Clostridium novyi</i>	198
17	<i>Esherichia coli</i> ATCC №25922 (F-50)	240533
18	<i>Staphylococcus aureus</i> №6538-P ATCC = №209-P FDA	201108
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC №9027 = CCM №1961	190155
20	<i>Bacillus cereus</i> 10702 ATCC = 8035 NCTC = 9122 NCIR	010014
21	<i>Bacillus subtilis</i> №6633	010011
22	<i>Alcaligenes faecalis</i>	415
23	<i>Clostridium novyi</i>	198
24	<i>Candida albicans</i>	Y-3108
25	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (<i>Aspergillus</i>	F-879

	<i>niger</i>)	
26	<i>Enterococcus faecalis</i>	1404
27	<i>Clostridium perfringens</i>	t. C. №3
28	<i>Clostridium chauvoei</i>	R ₁₅
29	<i>Clostridium Septicum</i>	1098
30	<i>Clostridium perfringens</i>	Tun D №213
31	<i>Streptococcus fecalis</i>	345
32	<i>Streptococcus fecalis</i>	356
33	<i>Streptococcus fecalis</i>	«Константиновский»
34	<i>Streptococcus fecalis</i>	«Соколово»
35	<i>Salmonella choleraesuis</i>	370
36	<i>Salmonella typhimurium</i>	371
37	<i>Salmonella abortusovis</i>	372
38	<i>Salmonella dublin</i>	373
39	<i>Streptococcus fecalis</i>	13

а также 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.

3.1.3 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 РНК КЧС были установлены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой реагент ПКО и СКО, содержащий РНК КЧС 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 РНК вируса КЧС 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 1,69% (для двух серий). Межсерийная воспроизводимость результатов исследования контрольных образцов на выявление РНК вируса КЧС 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 1,73%.

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. 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 клинико-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 РНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ОТ-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-КЧС» входят следующие материалы животного происхождения – БСА и рекомбинантная Taq-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 ОТ-ПЦР-РВ —имеющий каналы детекции, соответствующие красителям ROX, R6G, Cy5 (либо их спектральным аналогам) со следующими характеристиками – $\lambda_{\text{макс.погл.}}/\lambda_{\text{макс.флуорес.}}$: 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 (РНК-Технология, Россия), QuantStudio5 (Thermofisher, США).

Для проведения ОТ-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-РНК» (для выделения РНК) 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 РНК может быть использован в автоматизированных станциях KingFisher Flex System (Thermofisher, США) или их аналогах. Автоматизированные станции для выделения РНК должны быть установлены в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

Работу с набором «Ампли-Вет-КЧС» (для проведения ОТ-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, 2-20 мкл, 20-200 мкл и на 100-1000 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

5.4.1 Для выделения РНК 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);

холодильник на 2-8 °С.

5.4.2 Для выделения РНК на автоматизированных станциях

Холодильник на 2-8 °С.

5.4.3 Для постановки ОТ-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 РНК ручным методом

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

одноразовые 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 РНК 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 ОТ-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 (цельная кровь, мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки), патологический материал (миндалины, селезенка, легкие, печень, лимфоузлы и др.), а также продукты свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и изделия свиного происхождения (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.).

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 и ротоглотки 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 (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.), **продуктов свиного происхождения** помещают в стерильный контейнер. Лимфоузлы берут целиком.

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Выделение РНК проводят с помощью набора для экстракции РНК «М-Сорб-Вет-РНК» 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 ОТ-ПЦР-РВ. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения НК.

Для контроля выделения нуклеиновых кислот используют внутренний положительный контроль выделения (ВПК-РНК). Регистрация роста сигнала по каналу $Cy5$ свидетельствует об успешном выделении РНК.

6.4 Подготовка анализируемого материала

Кровь, мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки не требуют предварительной подготовки.

Пробы тканей, органов и продуктов свиного происхождения 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 течении 5 мин при 12 000 об/мин. Удаляют надосадочную жидкость. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствор натрия хлорида и используют в анализе.

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 1).

Таблица 1 – 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	Не допускается замораживание материала
Мазок с носоглотки и зева (ротоглотки)	Пластиковые пробирки и тампоны для мазков <***>	2-8 °С	≤ 72 часа: 2-8 °С ≤ 30 дней: -24 до -16 °С > 30 дней <*>: -70°С	Допускается однократное замораживание-оттаивание материала
Ткани, органы, продукты	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

* при невозможности обеспечить хранение при минус 70 С. Образцы хранить при минус 16-20 С;

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

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

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

7.1.1 Проведение выделения РНК ручным методом

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательные контроли выделения (**ОКО-В**) (1 на 10-20 исследуемых образцов, который потом обязательно анализируется в ОТ-ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения РНК.

ВНИМАНИЕ! Если при выполнении какой-либо операции во время выделения РНК 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!

ВНИМАНИЕ! При хранении в холодильнике возможна кристаллизация лизирующего раствора (**ЛОР**). Флакон с лизирующим раствором (**ЛОР**) следует прогреть при температуре не выше плюс 65°C, периодически встряхивая до полного исчезновения кристаллов. Все остальные реактивы необходимо довести до комнатной температуры и перемешать плавным переворачиванием. Пробирку с **ВПК-РНК**¹ встряхнуть на микроцентрифуге-встряхивателе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

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**;
- В каждую пробирку **ОКО-В** вносят по **100 мкл ОКО-В** из набора;
- Вносят по **100 мкл исследуемой пробы** (пробы крови вносят по **50 мкл**) в подготовленные пробирки, за исключением пробирок с **ОКО-В**.

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

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 **15 минут**, периодически перемешивая;
- Вынимают пробирки из термостата, охлаждают при комнатной температуре и перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе.
- Центрифугируют пробирки в течение **30 секунд** при максимальных оборотах на микроцентрифуге-встряхивателе;
- Вносят в пробирки по **10 мкл** внутреннего положительного контроля **ВПК-РНК**, перемешивают и сбрасывают капли с крышек кратковременным центрифугированием.

II. Сорбция и осаждение РНК

- Флакон с сорбирующим раствором **СР** тщательно перемешивают и вносят в пробирки по **60 мкл СР**;
- Тщательно перемешивают пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента и оставляют при комнатной температуре на **5 минут**.
- 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;

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

III. Промывка НК

- Добавляют в пробирки **500** мкл промывочного раствора **ПР-А**, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- 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 **500** мкл промывочного раствора **ПР-В**, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- 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 **500** мкл промывочного раствора **ПР-С**, перемешивают содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента;
- 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 **5 мин.** при температуре **65°C** для удаления остатков промывочного раствора **ПР-С**;

IV. Десорбция НК

- Готовят чистые 1,5 мл пробирки для следующего этапа (десорбции РНК). 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 **10 мин.** при температуре **65°C**;
- 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 РНК в чистые пробирки в соответствии с маркировкой.

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

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

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

- Включают управляющий компьютер и саму станцию.
- Подготавливают **5 планшетов и 1 гребёнку**;
- Вносят последовательно в лунки рабочего планшета **1 по 600**

мкл лизирующего раствора **ЛОР**, по **10 мкл ВПК-РНК** (входит в состав набора для проведения ОТ-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-РНК** 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 **планшета 2** по **600 мкл** промывочного раствора **А (ПР-А)**;

— Вносят в лунки **планшета 3** по **600 мкл** промывочного раствора **В (ПР-В)**;

— Вносят в лунки **планшета 4** по **600 мкл** промывочного раствора **С (ПР-С)**;

— Вносят в лунки **планшета 5** по **120 мкл** элюирующего раствора **(ЭР)**;

— Вносят в лунки подготовленного планшета 1 по **100 мкл образцов** (пробы крови вносят по **50 мкл**), 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
А						
В	ОКО-В					
С						
Д			ОКО-В			
Е						
Ф					ОКО-В	
Г						
Н						

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А												

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-РНК». Актуальный протокол выделения набором «М-Сорб-Вет-РНК» предоставляется по запросу.

7.1.3 Условия хранения анализируемых проб (образцов РНК)

Раствор РНК может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в течение 12 часов и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

7.2 Проведение ОТ-ПЦР-РВ набором реагентов «Ампли-Вет-КЧС»

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

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК 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 ОТ-ПЦР-РВ

— Отбирают необходимое количество стрипованных пробирок с лиофилизированной реакционной смесью АМПЛИ-ВЕТ-КЧС для амплификации образцов в количестве равном $N+2$, где N - количество исследуемых образцов и 2 - контрольные образцы (ПКО и ОКО);

— Раствор для разбавления ПКО (ОКО) и разбавитель (РБ) 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-КЧС² добавляют 200 мкл ОКО, перемешивают на вортексе до полного растворения, центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹;

ВНИМАНИЕ! Хранение разведенных препаратов ПКО-КЧС 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).

— Открывают крышки микропробирок и вносят в них по 15 мкл РБ;

— Вносят в пробирки (на стенку пробирки) по 20 мкл ОКО, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, ПКО-КЧС в соответствии с маркировкой, используя наконечники с аэрозольным барьером;

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

ВНИМАНИЕ! После смешивания реакционной смеси и препарата РНК микропробирки могут храниться в течение 15 мин. при температуре +2-8°С до установки в амплификатор и запуска ОТ-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 2 и вводят красители **ROX** (Orange), **R6G** (HEX/VIC/Yellow) и **Cy5** (Red). Для приборов Rotor-Gene устанавливают следующие значения уровня сигнала: Red – 5, Orange – 5, Yellow – 5;

Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	50 °С – 5 минут	1
2	95 °С – 3 минуты	
3	61 °С – 40 секунд Считывание сигнала флуоресценции (ROX, R6G, Cy5)	45
4	95 °С – 10 секунд	

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

— Закрывают крышку прибора, запускают реакцию ОТ-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 ОТ-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-КЧС**».

3.1 Создание шаблона «Ампли-Вет-КЧС»

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

² Если ПКО был приготовлен ранее, то размораживают пробирку с ПКО