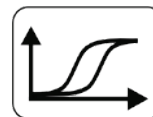




Для ветеринарного применения



1037 2024-08-02

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса диареи (BVDV) крупного рогатого скота
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Вирус диареи КРС

Декларация о соответствии

№ РОСС RU Д-RU.PA01.B.30395/24 от 30 июля 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	5
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	6
2.1 Состав набора реагентов.....	6
2.2 Количество анализируемых образцов.....	7
2.3 Принцип метода	7
2.4 Время проведения анализа	8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
3.1 Аналитическая специфичность	9
3.2 Интерферирующие вещества	9
3.3 Предел обнаружения	10
3.4 Диагностические характеристики.....	11
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	12
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	14
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	16
6.1 Материал для исследования	16
6.2 Общие требования	16
6.3 Взятие материала на исследование	17
6.5 Подготовка биологического материала для выделения РНК.....	19
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	20
7.1 Выделение РНК из биологического материала.....	20
7.2 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка S, ручное дозирование.....	21
7.3 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка S, стрипы с использованием дозирующего устройства ДТстрим	24
7.4 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка U, ручное дозирование.....	26
7.5 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*»)	29
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	31
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	31
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	32
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	33
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	33
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	33
15 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВД КРС / BVDV	- вирусная диарея крупного рогатого скота / Bovine Viral Diarrhea Virus
ВК	- внутренний контроль
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
кДНК	- комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
КРС	- крупный рогатый скот
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ОТ	- обратная транскрипция
ПИ	- персистентная инфекция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКаза	- рибонуклеазы
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат

ВВЕДЕНИЕ

Вирусная диарея крупного рогатого скота является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний в животноводстве. Вирус распространен практически повсеместно, что является глобальной проблемой, затрагивающей множество стран и оказывающей существенное влияние на экономику и благосостояние животноводческих хозяйств.

Возбудитель вирусной диареи крупного рогатого скота – Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), относится к роду Pestivirus, семейству Flaviviridae. Содержит одноцепочечную молекулу РНК.

В результате инфицирования BVDV наблюдается широкий диапазон клинических проявлений, включающих энтеральные и респираторные болезни КРС или репродуктивные или фетальные болезни после инфицирования восприимчивых племенных самок. Инфекция может носить субклиническую форму или развиваться в серьезную смертельную болезнь. Вирусы BVDV также приводят к подавлению иммунитета, что делает инфицированных животных более восприимчивыми к инфицированию другими вирусами или бактериями. Животные, выжившие в результате внутриутробного инфицирования, почти всегда являются персистентно инфицированными. Они представляют основной резервуар вируса в популяции и выделяют большое количество вируса с мочой, фекалиями, выделениями, молоком и спермой.

Основным путем распространения вируса является контакт с персистентно инфицированными животными или животными находящимися в острой фазе заболевания. Также важную роль играет вертикальная передача вируса. Вирус может сохраняться в окружающей среде в течение коротких периодов времени или может передаваться с контаминированными репродуктивным материалами.

Правильная и своевременная диагностика этого заболевания имеет ключевое значение для его контроля. Одним из наиболее эффективных методов диагностики является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Этот метод в короткие сроки и с высокой точностью позволяет выявить наличие вируса, определить зараженных животных, предотвратить распространение инфекции и применить необходимые меры для минимизации негативных последствий.

Список литературы

1. A. Khodakaram-Tafti¹, GH. Farjanikish. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds // Iran J Vet Res. 2017 Summer; 18(3): 154–163.
2. Всемирная организация здоровья животных (МЭБ): Руководство по наземным животным: Наземное руководство бычки: Глава 3.4.7 Вирусная диарея крупного рогатого скота.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления РНК вируса диареи (BVDV) крупного рогатого скота методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Вирус диареи КРС), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления РНК вируса диареи (BVDV) в биологическом материале животных (мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта, фекалии, сперма, кровь, тканевой материал) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования:

- симптомы инфекционных заболеваний, вызванных вирусом диареи (BVDV), и эпидемиологически связанные случаи;
- скрининг бессимптомного носительства.

Противопоказаний к применению нет.

1.5 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в диагностической лаборатории: врач диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (лабораторный техник).

1.6 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов для выявления РНК вируса диареи (BVDV) крупного рогатого скота методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Вирус диареи КРС) выпускается в стандартной фасовке (маркируется – фасовка S, стрипы; фасовка S, пробирки) и в универсальной фасовке для ручного и автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка U).

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-V105-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,62 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт		

REF R1-V105-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 15 мкл
ОТ-ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,62 мл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	55 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК» указывается как «РНК-ВК»

REF R1-V105-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
ОТ-ПЦР-буфер «U»	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Фермент Taq/RT	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
Внутренний контрольный образец РНК-ВК ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
- Инструкция по применению – 1 экз.
- Паспорт – 1 экз.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Метод: обратная транскрипция РНК с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации кДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Этапы обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК проводят в одной пробирке, что повышает чувствительность метода, уменьшает вероятность контаминации и снижает время проведения исследования.

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+», «Внутренний контрольный образец РНК-ВК» указывается как «РНК-ВК»

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина (для фасовки S) или использованием Taq-полимеразы, блокированной антителами (для фасовки U). Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав набора реагентов включен внутренний контрольный образец РНК-ВК, который добавляется в анализируемые образцы на стадии выделения РНК и предназначен для оценки этапа выделения РНК и качества прохождения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации кДНК вируса диареи BVDV крупного рогатого скота, включена флуоресцентная метка Fam.

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца РНК-ВК, входит флуоресцентный краситель Hex.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Вирус диареи КРС	ВК*	–	–	–
* – внутренний контрольный образец РНК-ВК				

Исследование состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификация кДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов Вирус диареи КРС.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2,5 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения НК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих РНК вируса BVDV, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента РНК вируса BVDV) по каналу детекции Fam.

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вируса BVDV, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента РНК вируса BVDV) по каналу детекции Fam и положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца РНК-ВК по каналу детекции Hex.

В ходе НИОКР была проведена проверка специфичности набора реагентов.

При наличии в образцах РНК вируса диареи крупного рогатого скота наблюдались специфические положительные результаты амплификации. Референсные штаммы были получены из вакцины Bovi Shild Gold.

Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций выявляемого показателя, входящего в состав набора, по отношению к другой мишени системы. Отсутствовали неспецифические положительные результаты амплификации при наличии в образцах других нуклеиновых кислот, потенциально присутствующих в образце биоматериала.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ОТ-ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (недоверенных) результатов. Признаком ингибирования ОТ-ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. 2.3, 9.3).

К ингибиторам ОТ-ПЦР отнесены следующие вещества: гемоглобин, триглицериды, билирубин, холестерин, слизь (муцин), оставшиеся в образце РНК в результате неполного их удаления в процессе выделения РНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, которые могут присутствовать в образце РНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ОТ-ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Концентрация интерферирующих веществ
<i>Эндогенные вещества</i>		
Кровь	Билирубин	684 мкмоль/л
	Холестерин	13 ммоль/л
	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Триглицериды	37 ммоль/л
Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Муцин	20%
Тканевой материал	Гемоглобин	0,35 мг/мл
Сперма	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Муцин	20%
Фекалии	Билирубин	684 мкмоль/л
	Холестерин	13 ммоль/л
	Гемоглобин	0,35 мг/мл
	Триглицериды	37 ммоль/л
	Муцин	20%
<i>Экзогенные вещества</i>		
Кровь, мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта, тканевой материал, сперма, фекалии	Изопропиловый спирт	10%
	Метилацетат	10%

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты и др. удаляются в процессе выделения РНК с использованием наборов реагентов для пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ОТ-ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО) и составляет 10 копий нуклеиновой кислоты на амплификационную пробирку или $1,0 \times 10^3$ копий/мл препарата РНК.

Предел обнаружения зависит от вида биоматериала, используемого набора/комплекта реагентов для выделения НК и конечного объема элюции (разведения) выделенной РНК. Например, предел обнаружения соответствует следующим значениям концентрации НК для мазков/соскобов из дыхательных путей в 500 мкл транспортной среды¹ при использовании указанных наборов/комплектов реагентов для выделения НК:

Выявляемый показатель	Копий на амплификационную пробирку	Копий\мл препарата НК	ГЭ\мл препарата НК	Копий/мл образца		
				ПРОБА-НК	ПРОБА-МЧ-РАПИД II	ПРОБА-МЧ DWP
Вирус диареи КРС	10	1,0x10 ³	1,0x10 ³	5,0x10 ²	5,0x10 ³	1,0x10 ³

3.4 Диагностические характеристики

Количество исследований (n) – 300.

Диагностическая чувствительность (95% ДИ) – 100% (95,6 – 100%).

Диагностическая специфичность (95% ДИ) – 100% (96,7 – 100%).

¹ – в качестве транспортной среды использовалась Транспортная среда для биопроб STOP-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям национального законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с нормативными документами и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в диагностической лаборатории.

Выделение НК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ОТ-ПЦР 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.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводятся выделение НК и постановка ОТ-ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных нормативными документами.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ОТ-ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ОТ-ПЦР.

При использовании набора реагентов в диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями нормативных документов.

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента		Указание на риски
	Фасовка S	Фасовка U	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–	–
Смесь для амплификации	–	Нет опасных веществ	–
ОТ-ПЦР-буфер	Нет опасных веществ	–	–
ОТ-ПЦР-буфер «U»	–	Нет опасных веществ	–
Фермент Taq/RT	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
Внутренний контрольный образец РНК-ВК	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Является безопасным для конечного пользователя

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизи- рованное
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	да	да ²
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да	да
ротатор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	да ³	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да	да
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок ⁴	нет	нет	да	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения ДТстрим 12М1 или ДТстрим 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим	да ⁵	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *М1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	да ⁵	нет	нет	да
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	нет	да ⁶	да
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	да ⁶	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов ПЦР	нет	нет	да ⁶	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да
транспортная среда (при необходимости), рекомендуется использовать Транспортную среду для биопроб STOP-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640 или транспортную среду, рекомендованную в инструкции к используемому набору реагентов для выделения РНК физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный				

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное
набор/комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала ⁷ , рекомендуются: – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; – Набор реагентов для выделения ДНК/РНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека (ПРОБА-МЧ-РАПИД II) по ТУ 21.20.23-136-46482062-2023, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия; – Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ DWP) по ТУ 21.20.23-062-46482062-2020, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/15090				
Дополнительно для предобработки тканевого (аутопсийного) материала и фекалий:				
бокс биологической безопасности II класса				
центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF(g) не ниже 10000				
дезинфицирующий раствор				
Дополнительно для предобработки фекалий:				
глицерин				
Примечания к таблице: ¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже ² – только детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм *Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 ³ – только при использовании пробирок ⁴ – не используется для детектирующего амплификатора «ДТлайт» ⁵ – только для автоматизированного дозирования ⁶ – при использовании микропланшетов ⁷ – для выделения РНК вируса диареи (BVDV) допускается использование любых наборов реагентов, рекомендованных производителями для выделения РНК из соответствующего вида биоматериала с целью дальнейшего исследования методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения РНК вируса диареи (BVDV) определяется видом биологического материала (7.1)				

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объемом реакционной смеси 40 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex (Vic);
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

Для набора реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования), далее по тексту – «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228 (только для набора реагентов в фасовке S; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок), далее по тексту – «ДТлайт».

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта, фекалии, сперму, кровь, тканевой материал.

ВНИМАНИЕ! Вид биологического материала для ПЦР-исследования определяет ветеринарный врач на основании знаний о патогенезе болезни, клинической картины, поставленной цели исследования и руководствуясь действующими регламентирующими документами.

6.2 Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

На этапах подготовки биоматериала и выделении из него РНК, за исключением этапа отбора надосадочной жидкости с использованием аспиратора, используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить биологический материал, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют в соответствии с требованиями отраслевых стандартов.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением РНК может потребоваться предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

6.3.1 Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта

Взятие материала осуществляют стерильным зондом, предназначенным для данного источника биологического материала. После взятия материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением, прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте. Плотно закройте и промаркируйте пробирку.

6.3.2 Тканевой материал

Поместите тканевой материал (фрагменты тканей и органов) массой не более 1,0 г, в стерильный пластиковый контейнер.

6.3.3 Фекалии

Для анализа используют образцы фекалий массой (объемом) примерно 1,0–3,0 г (1,0–3,0 мл). Взятие материала проводится отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками в специальный стерильный сухой флакон в количестве примерно 1,0 г. После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

6.3.4 Сперма

Сбор спермы проводится в стерильный пластиковый контейнер для взятия, хранения и транспортирования биологических образцов объемом 50–60 мл в количестве не менее 2,0 мл.

6.3.5 Кровь

Кровь для анализа берут из яремной или хвостовой вены крупного рогатого скота стерильной иглой с соблюдением правил асептики и антисептики, пользуясь отдельной иглой для каждого животного. Взятие крови проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов реагентов для выделения НК¹.

¹ – для выделения РНК вируса диареи (BVDV) допускается использование любых наборов реагентов, рекомендованных производителями для выделения РНК из крови с целью дальнейшего исследования методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала определяются инструкциями по применению используемых наборов реагентов для выделения НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

6.4.1 Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта

Допускается транспортирование и хранение¹ образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

6.4.2 Тканевой материал

Тканевой материал допускается транспортировать и хранить¹:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.3 Образцы фекалий

Образцы нативных фекалий допускается транспортировать и хранить¹:

- при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

Фекальную суспензию с глицерином допускается транспортировать и хранить:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание нативных фекалий.

6.4.4 Сперма

Образцы спермы допускается транспортировать и хранить¹:

- при температуре от 18 °С до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 20 °С и ниже – в течение 7 суток;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.5 Кровь

Образцы крови допускается транспортировать и хранить¹:

- при температуре от 20 до 25 °С – не более 6 часов с момента взятия материала;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 48 часов с момента взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Цельную кровь замораживать запрещено!

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектam реагентов для выделения НК или используемым для транспортирования и хранения образцов транспортным средам

6.5 Подготовка биологического материала для выделения РНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с данной инструкцией (6.5.1 – 6.5.5).

6.5.1 Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта

Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта не требуют предварительной подготовки.

6.5.2 Тканевой материал

6.5.2.1 Гомогенизируйте 0,2–0,3 см³ (200–300 мкл) тканевого материала с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора.

6.5.2.2 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл примерно 100 мкл тканевого гомогената.

6.5.2.3 Добавьте к гомогенату 900 мкл стерильного физиологического раствора, закройте пробирку.

6.5.2.4 Тщательно перемешайте содержимое пробирки на микроцентрифуге-вортексе.

6.5.2.5 Центрифугируйте пробирку с полученной суспензией при RCF(g) 10000 в течение 2 минут.

Образец готов для выделения РНК. Для выделения РНК используют 100 мкл надосадочной жидкости.

6.5.3 Фекалии

6.5.3.1 Подготовьте необходимое количество одноразовых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с 1,0 мл стерильного физиологического раствора.

6.5.3.2 Поместите в каждую пробирку примерно 0,1–0,2 г (мл) фекалий.

6.5.3.3 Тщательно ресуспендируйте содержимое пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 5–10 с.

Примечание – При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к суспензии фекалий в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида добавляют глицерин в конечной концентрации 10–15%. Подготовленные таким образом образцы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 минут.

6.5.3.4 Центрифугируйте пробирки с образцами суспензий фекалий при RCF(g) 10000 при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 30 с для осаждения дебриса на дно пробирки.

6.5.3.5 Промаркируйте по одной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К–».

6.5.3.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки 100 мкл надосадочной жидкости из пробирок с суспензиями фекалий.

6.5.3.7 Внесите в пробирку «К–» 100 мкл отрицательного контрольного образца, согласно инструкции по применению используемого набора реагентов для выделения НК.

Образцы готовы для выделения РНК.

6.5.4 Сперма

6.5.4.1 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром, 50 мкл спермы.

6.5.4.2 Добавьте в пробирку с образцом спермы 150 мкл стерильного физиологического раствора.

6.5.4.3 Тщательно перемешайте содержимое пробирки на микроцентрифуге-вortexе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вortexе в течение 3–5 с.

Образец готов для выделения РНК.

6.5.5 Кровь

Образцы цельной крови не требуют предварительной подготовки.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение РНК из биологического материала

Для выделения РНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования РНК методом ОТ-ПЦР, например, ПРОБА-НК, ПРОБА-МЧ-РАПИД II, ПРОБА-МЧ DWP (таблица 2).

Допускается использование любых наборов реагентов, рекомендуемых производителями для выделения РНК из образцов биологического материала животных с целью последующего исследования методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 2 – Наборы/комплекты реагентов, валидированные для выделения РНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов Вирус диареи КРС

Набор/комплект реагентов	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
Комплект реагентов ПРОБА-НК, РУ № ФСР 2010/08867	Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта, тканевой материал, фекалии, сперма	50
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД II	Мазки/соскобы из дыхательных путей и урогенитального тракта	100
Набор реагентов ПРОБА-МЧ DWP, РУ № РЗН 2021/15090	Мазки/соскобы из дыхательных путей	100

Использование контрольных образцов на этапе выделения нуклеиновых кислот

Внутренний контрольный образец

Для исключения ложноотрицательных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно добавление **внутреннего контрольного образца** в анализируемые образцы на этапе выделения нуклеиновых кислот.

В качестве внутреннего контрольного образца при выделении РНК необходимо использовать **внутренний контрольный образец РНК-ВК** из состава набора реагентов Вирус диареи КРС.

РНК-ВК следует использовать в объеме 20 мкл на образец.

ВНИМАНИЕ!

1. Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) и внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) из состава комплекта реагентов ПРОБА-НК при выделении НК **не используют**.
2. Внесение РНК-ВК из состава набора реагентов Вирус диареи КРС при выделении РНК необходимо проводить в следующем порядке: внести в каждую пробирку по 20 мкл РНК-ВК, затем добавить в каждую пробирку лизирующий раствор, затем внести в соответствующие промаркированные пробирки образцы исследуемого материала и провести выделение РНК согласно инструкции по применению используемого набора/комплекта реагентов для выделения НК.

Отрицательный контрольный образец

Для исключения ложноположительных результатов исследования и контроля качества исследования обязательно использование **отрицательного контрольного образца** с этапа выделения нуклеиновых кислот.

На этапе выделения нуклеиновых кислот обязательно подготовить **отрицательный контрольный образец** и провести его через все этапы выделения одновременно с выделением РНК из клинических образцов. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

7.2 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка S, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 6 образцов. Для этого нужно промаркировать 6 пробирок для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 8.

7.2.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 15 × (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера,
- 0,5 × (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–» и «К+».

Пример:

Необходимо проанализировать 6 образцов. Промаркированных пробирок – 8. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT для 9 (8+1) пробирок, т.е. 135 мкл ОТ-ПЦР-буфера + 4,5 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.2.4 Тщательно перемешайте содержимое пробирки с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.2.5 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 15 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT. Закройте пробирки/стрипы.

7.2.6 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед внесением в пробирки с реакционной смесью для препарата РНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата РНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-НК встряхните пробирки с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ DWP центрифугируйте заклеенный плёнкой глубоколоночный планшет с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом при RCF(g) 100 в течение 30 с для осаждения конденсата и снимите плёнку.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.2.7 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл выделенного из образцов препарата РНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», РНК не вносится.
- 7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 10 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.
- 7.2.9 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 10 мкл положительного контрольного образца.
- 7.2.10 Центрифугируйте пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.2.11 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.
- 7.2.12 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ОТ-ПЦР загрузите соответствующий файл с параметрами теста¹. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.11) и проведите ОТ-ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

¹ – инструкции по добавлению готовых файлов с параметрами теста находятся на сайте в разделе «Поддержка»

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм» и «ДТлайт» (фасовка S)

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	35	15	00	1		Цикл
2	92	0	30	1		Цикл
3	92	0	10	8		Цикл
	64	0	15		√	
4	90	0	5	40		Цикл
	64	0	15		√	
5	64	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

7.3 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка S, стрипы с использованием дозирующего устройства ДТстрим

ВНИМАНИЕ!

- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
- Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.3.1 Промаркируйте по одной стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

Пример:

Необходимо проанализировать 6 образцов. Для этого нужно промаркировать 6 пробирок для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество – 1 стрип.

7.3.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер» и «Фермент Taq/RT» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.3 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT. Следуйте указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим или смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 15 × (N+1) мкл ОТ-ПЦР-буфера,
- 0,5 × (N+1) мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–» и «К+».

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.3.4 Тщательно перемешайте содержимое пробирки с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.3.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата РНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата РНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-НК встряхните пробирки с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ DWP центрифугируйте заклеенный плёнкой глубоколоночный планшет с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом при RCF(g) 100 в течение 30 с для осаждения конденсата и снимите плёнку.

7.3.6 Установите пробирки со смесью ОТ-ПЦР-буфера и фермента Taq/RT, пробирки или глубоколоночный планшет с препаратами РНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также стрипы со смесью для амплификации на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.7 Закройте стрипы.

7.3.8 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.9 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.3.10 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ОТ-ПЦР загрузите соответствующий файл с параметрами теста¹. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.3.9) и проведите ОТ-ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

7.4 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.
Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объёмом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок², герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постамплификационной контаминации.

2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.4.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых амплификационных пробирок объёмом 0,2 мл или микропланшет 96 лунок для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки/зарезервировать 4 лунки микропланшета для неизвестных образцов, одну пробирку/лунку для «К-» и одну пробирку/лунку для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 6.

7.4.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.3 Внесите во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.

7.4.4 Тщательно перемешайте содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер «U»» и «Фермент Taq/RT» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

¹ – инструкции по добавлению готовых файлов с параметрами теста находятся на сайте в разделе «Поддержка»

² – для детектирующего амплификатора «ДТлайт» микропланшеты 96 лунок не используются

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.5 Приготовьте смесь ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- $6,0 \times (N+1)$ мкл ОТ-ПЦР-буфера «U»,
- $0,3 \times (N+1)$ мкл фермента Taq/RT,

где N – количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К–» и «К+».

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца, «К–», «К+». Промаркированных пробирок/необходимых лунок микропланшета – 6. Нужно приготовить смесь ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT для 7 (6+1) пробирок/лунок, т.е. 42 мкл ОТ-ПЦР-буфера «U» + 2,1 мкл фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей. Тщательно смыть остатки фермента Taq/RT с наконечника пипетированием не менее 5 раз.

7.4.6 Тщательно перемешайте содержимое пробирки с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.4.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT. Закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT в пробирки/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение одного часа выполнить 7.4.8 – 7.4.14.

7.4.8 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед внесением в пробирки/лунки с реакционной смесью для препарата РНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата РНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-НК встряхните пробирки с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ DWP центрифугируйте заклеенный плёнкой глубоколоночный планшет с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом при RCF(g) 100 в течение 30 с для осаждения конденсата и снимите плёнку.
4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением РНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты РНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.
- 7.4.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата РНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К-» и «К+», РНК не вносится.
- 7.4.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К-», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.
- 7.4.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.4.12 В случае использования микропланшетов 96 лунок:
- 7.4.12.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.
- 7.4.12.2 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
- 7.4.12.3 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
- 7.4.13 В случае использования пробирок:
- Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.4.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора и проведите ОТ-ПЦР (7.4.15).
- 7.4.15 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ОТ-ПЦР загрузите соответствующий файл с параметрами теста¹. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.4.14) и проведите ОТ-ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

¹ – инструкции по добавлению готовых файлов с параметрами теста находятся на сайте в разделе «Поддержка»

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм» и «ДТлайт» (фасовка U)

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	47	20	0	1		Цикл
2	95	5	0	1		Цикл
3	94	0	10	50		Цикл
	64	0	15		√	
4	80	0	1	1		Цикл
5	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

7.5 Подготовка и проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *X*»)

ВНИМАНИЕ!

- Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 384 лунки, герметизируемые термоплёнкой.
- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирку со смесью для амплификации!

Примечание – Рекомендуются постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

7.5.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.5.2 Тщательно перемешайте содержимое пробирок «ОТ-ПЦР-буфер «U»» и «Фермент Taq/RT» на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент Taq/RT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.5.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT.

ВНИМАНИЕ! При взятии фермента Taq/RT необходимо погружать наконечник не более чем на 1,0 мм и соблюдать правила дозирования вязких жидкостей.

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

7.5.4 Тщательно перемешайте содержимое пробирки с приготовленной смесью ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

Смесь можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного часа.

7.5.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата РНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата РНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-НК встряхните пробирки с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения РНК набора реагентов ПРОБА-МЧ DWP центрифугируйте заклеенный плёнкой глубоколоночный планшет с препаратом РНК и отрицательным контрольным образцом при RCF(g) 100 в течение 30 с для осаждения конденсата и снимите плёнку.

7.5.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ОТ-ПЦР-буфера «U» и фермента Taq/RT, пробирки или глубоколоночный планшет с препаратами РНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.5.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.5.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.5.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.5.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.

7.5.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ОТ-ПЦР загрузите файл с параметрами теста¹. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.5.10) и проведите ОТ-ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

¹ – инструкции по добавлению готовых файлов с параметрами теста находятся на сайте в разделе «Поддержка»

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 5. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 5 – Интерпретация результатов ОТ-ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam (Вирус диареи КРС) Ср	Hex (ВК) Ср	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса диареи (BVDV) КРС
Не указан	Указан	Не обнаружена РНК вируса диареи (BVDV) КРС
Не указан	Не указан	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	Указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Указан	Не учитывается	Положительный результат Результаты постановки валидны

9.3 Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из биологического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ОТ-ПЦР с имеющимся препаратом РНК, либо повторное выделение РНК и постановка ОТ-ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.4 При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.5 При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.
- 10.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.
- 10.1.3 Допускается транспортирование фермента Taq/RT в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C не более 5 суток.
- 10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.
- 10.2.2 Фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.
- 10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- все компоненты набора реагентов, за исключением фермента Taq/RT, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте;
 - фермент Taq/RT следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями национального законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями национального законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Температурный диапазон		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Номер по каталогу
	Использовать до		Изготовитель
	Код партии (серии)		Не допускать воздействия солнечного света
	Дата изготовления		Нестерильно

15 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4;
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru