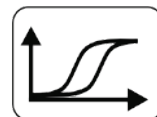




Для ветеринарного применения



641-2 2024-06-26

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV)
методом ПЦР в режиме реального времени

Провирусная ДНК вируса лейкоза КРС

Декларация о соответствии

№ РОСС RU Д-RU.РА01.В. 22103/24 от 03 июня 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	6
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	7
2.1 Состав набора реагентов	7
2.2 Количество анализируемых образцов	8
2.3 Принцип метода	8
2.4 Время проведения анализа	9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
3.1 Аналитическая специфичность	10
3.2 Интерферирующие вещества.....	10
3.3 Предел обнаружения.....	11
3.4 Диагностические характеристики	11
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	12
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	14
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	17
6.1 Материал для исследования.....	17
6.2 Общие требования	17
6.3 Взятие материала на исследование	17
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала	17
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	18
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	18
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	18
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S, стрипы с использованием дозирующего устройства ДТстрим	21
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	22
7.5 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	25
7.6 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка A, пробирки	27
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	28
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	29
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	30
10.1 Транспортирование	30
10.2 Хранение	30
10.3 Указания по эксплуатации	31
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	31
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	31
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	32
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	33
16 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
ВЛКРС / BLV	- вирус лейкоза крупного рогатого скота / от англ. Bovine Leukemia Virus
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ИВ	- интерферирующие вещества
К–	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
КВМ	- контроль взятия материала
КРС	- крупный рогатый скот
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РИД	- реакция иммунодиффузии
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКаза	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота – это хроническое вирусное заболевание опухолевой природы, которое может протекать как бессимптомно, так и с проявлением лимфоцитоза и злокачественными образованиями в кроветворных и других органах и тканях. Лейкоз КРС распространен на всех континентах и во всех странах мира и уже многие годы считается одним из самых проблемных заболеваний в вопросах лечения и профилактики.

Возбудителем болезни является РНК-содержащий онкогенный вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), или Bovine leukemia virus (BLV), относящийся к роду Deltaretrovirus семейства Retroviridae. Этот вирус поражает крупный рогатый скот всех возрастов. Заражение может произойти через кровь, молоко, другие биологические жидкости или предметы, содержащие лимфоидные клетки животных, в которых находится вирус, а также сперму инфицированных быков. Редко возбудитель передается через плаценту матери теленку. Чаще всего телята инфицируются с молоком матери после рождения.

У заражённых животных ослабляется иммунная система организма, больные коровы становятся значительно восприимчивее к инфекционным и незаразным заболеваниям. Вследствие этого увеличивается яловость, снижается выход телят, учащаются случаи самопроизвольных аборт. Телята от таких коров чаще страдают расстройствами пищеварения и болезнями органов дыхания.

Основной урон экономике животноводства от лейкоза КРС состоит в существенном снижении качества молочной и мясной продукции. Молоко и молозиво, полученные от больных восприимчивых животных, подлежат уничтожению. Без термической обработки молоко инфицированного скота нельзя использовать для реализации без ограничений, согласно разделу 34 приказа Минсельхоза от 24 марта 2021 г. N 156. "Об утверждении ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов лейкоза крупного рогатого скота". Продажа племенного скота из таких хозяйств запрещена.

Зараженное лейкозом поголовье крупного рогатого скота выбраковывается и отправляется на убой.

Особенность лейкоза состоит в том, что установить диагноз на ранних стадиях заболевания можно только в лабораторных условиях. Согласно приказу Минсельхоза от 24 марта 2021 г. N 156 образцы крови всех чувствительных животных старше полугода проверяют серологическими методами, в частности, РИД, один раз в год, животных-продуцентов – 2 раза в год с интервалом не менее 180 календарных дней (раздел 9).

В случае положительного результата РИД при отсутствии клинических проявлений заболевания животное не считается больным, а лишь вирусоносителем, и, в любом случае, является распространителем инфекции. Образцы крови таких животных исследуют гематологическим методом (подсчет лейкоцитов методом микроскопии). При отрицательных

результатах гематологических исследований и отсутствии патологоанатомических изменений, восприимчивые животные считаются инфицированными восприимчивыми животными. В случае, если получен положительный результат гематологических исследований или обнаружены патологоанатомические изменения, восприимчивое животное считается больным восприимчивым животным.

Таким образом, эффективность существующих методов лабораторной диагностики вируса лейкоза КРС невысока, трактовка результатов неоднозначна, а установление и подтверждение диагноза требует больших временных затрат. Наиболее перспективным подходом для решения задачи получения точного результата за короткий временной промежуток (от двух часов с момента поступления образца крови в лабораторию) является молекулярно-генетический метод с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод позволяет определить наличие провирусной ДНК (ДНК-копию вируса, встроенную в геном животного), и, соответственно, результат исследования однозначен. Поэтому метод ПЦР может быть применим для диагностики лейкоза КРС не только у взрослых животных, но и для скрининга молодняка в возрасте до 6 месяцев, т.е. до созревания иммунной системы телёнка, когда метод РИД ещё не показателен. Исследование методом ПЦР будет также весьма эффективно при проведении оздоровительных мероприятий согласно приказу Минсельхоза от 24 марта 2021 г. N 156, которые сводятся к периодическим систематическим исследованиям поголовья КРС.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) методом ПЦР в режиме реального времени (Провирусная ДНК вируса лейкоза КРС), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК интегрированной формы вируса (провируса) лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в образцах крови КРС методом ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов выявляет все известные генотипы BLV, а именно: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

1.3 Показания к проведению исследования:

- инфекционный контроль поголовья крупного рогатого скота;
- контроль наличия вируса лейкоза КРС у телят, рождённых инфицированными коровами с целью проведения карантинных мероприятий и предотвращения вертикального переноса вируса;
- инфекционный скрининг КРС при ветеринарной обработке животных с целью предотвращения возможного распространения инфекции для межхозяйственного обмена животными;
- подозрение на присутствие инфицированных животных в стаде с целью предотвращения горизонтальной передачи вируса.

Противопоказаний к применению нет.

1.4 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в диагностической лаборатории.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов Провирусная ДНК вируса лейкоза КРС выпускается в стандартной фасовке (маркируется – фасовка S, стрипы; фасовка S, пробирки), в универсальной фасовке для ручного и автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка U) и в фасовке для автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка A, пробирки).

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-V101-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 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая 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-V101-23/9, 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 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-V101-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
Полимераза ТехноTaq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

REF R1-V101-VA/X, фасовка А, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для ПЦР Стрим	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	4 пробирки	по 1,2 мл
Полимераза ТехноТaq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
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).

Набор реагентов в фасовке А рассчитан на проведение 384 определений (одна постановка 384 или две постановки по 192), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для фасовки S методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки. «Горячий» старт для фасовок U и А

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В состав смеси для амплификации входит смесь для определения ДНК крупного рогатого скота (ДНК КРС) как контрольного показателя, который позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для проведения анализа, а также исключить ошибки преаналитического этапа при исследовании образцов крови КРС и избежать получения недостоверных или ложноотрицательных результатов ПЦР.

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

В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации провирусной ДНК вируса лейкоза КРС, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК КРС, входит флуоресцентный краситель Hex. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Провирусная ДНК BLV	ДНК КРС	–	–	–

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов Провирусная ДНК вируса лейкоза КРС.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих провирусную ДНК вируса лейкоза КРС, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента провирусной ДНК BLV) по каналу детекции Fam.

В образцах биологического материала, не содержащих провирусную ДНК вируса лейкоза КРС, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента провирусной ДНК BLV) по каналу детекции Fam и положительный результат амплификации ДНК КРС по каналу детекции Hex.

В ходе НИОКР была проведена проверка специфичности набора реагентов.

При наличии в образцах провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) наблюдались специфические положительные результаты амплификации. Специфичность была подтверждена в ходе НИР методом секвенирования по Сэнгеру последовательности фрагмента генома вируса, полученного с использованием набора реагентов. Код номенклатуры GenBank* (Sequence ID) FJ914764.1¹.

Наблюдалось отсутствие перекрестных неспецифических реакций всех исследуемых мишеней по отношению друг к другу. Отсутствовали неспецифические положительные результаты амплификации при наличии в образцах ДНК других микроорганизмов, потенциально присутствующих в образце биоматериала.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (недостоверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации ДНК КРС и специфического продукта (см. 2.3, 9.3).

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

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

¹ – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

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
<i>Экзогенные вещества</i>		
Кровь	Изопропиловый спирт	10%
	Метилацетат	10%

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как кровь, местные лекарственные препараты и др. удаляются в процессе выделения НК с использованием наборов реагентов для пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО) и составляет 5 копий ДНК на амплификационную пробирку или $1,0 \times 10^3$ копий/мл препарата ДНК.

Предел обнаружения зависит от используемого набора реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК.

Выявляемый показатель	Копий/амплификационную пробирку	Копий/мл препарата ДНК	Копий/мл биологического материала (кровь) (объем элюции, мкл)			
			ПРОБА-ОПТИМА МАКС (100 мкл)		ПРОБА-МЧ МАКС (50 мкл)	ПРОБА-ЦИТО ВЕТ (200 мкл)
			Выделение ДНК из 100 мкл крови ¹	Выделение ДНК из 500 мкл крови ¹		
Провирусная ДНК BLV	5,0	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$

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 – при добавлении 100 мкл лизирующего раствора

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям правил 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, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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 санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 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 ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к 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 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 санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм 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».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента			Указание на риски
	Фасовка S	Фасовка U	Фасовка A	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	–	–	–
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	–	–	–
Минеральное масло	Нет опасных веществ	–	–	–
Смесь для амплификации	–	Нет опасных веществ	–	–
Смесь для амплификации Стрим	–	–	Нет опасных веществ	–
Полимераза ТехноTaq MAX	–	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
ПЦР-буфер	–	Нет опасных веществ	–	–
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	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 исключен.

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	Фасовка A, пробирки
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	да ²
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротатор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ³	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	да ⁴	да ⁵	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ³	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл; 1,5 мл	да	да	да
дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные, позволяющие отбирать объемы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	нет
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	нет
штатив для дозаторов	да	да	нет
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	нет
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок	нет	да ⁶	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	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 ⁷	да ⁷	нет
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения ДТстрим 12М4 или ДТстрим 15М4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим	нет	нет	да

¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² – только детектирующий амплификатор «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229

³ – только для фасовки S, стрипы

⁴ – только для фасовки S, пробирки

⁵ – только для ручного дозирования с использованием пробирок

⁶ – только для ручного дозирования

⁷ – для автоматизированного дозирования

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S	Фасовка U	Фасовка A, пробирки
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	да ¹	да ¹	нет
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M4, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	нет	да
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	да ²	да
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да ²	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов ПЦР	нет	да ²	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да ¹	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный			
набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала ³ , рекомендуются: – Набор реагентов для выделения ДНК из крови сельскохозяйственных и домашних животных (ПРОБА-ЦИТО ВЕТ) по ТУ 21.10.60-001-46482062-2020, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, ДС № РОСС RU Д-RU.CC07.B.00279/20; – Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС по ТУ 21.20.23-124-46482062-2021, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496; – Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2021/14391.			

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 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовки A, U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °C;
- скорость нагрева не менее 2 °C/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °C.

¹ – для автоматизированного дозирования

² – при использовании микропланшетов

³ – для выделения провирусной ДНК BLV допускается использование любых наборов реагентов, рекомендованных производителями для выделения ДНК из соответствующего вида биоматериала с целью дальнейшего исследования методом ПЦР в режиме реального времени

Для работы с набором 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 фасовках А, У 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 У 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 цельную периферическую кровь КРС.

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 этапе подготовки биоматериала используйте 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 Приказа Министерства сельского хозяйства РФ от 24 марта 2021 г. N 156, ГОСТ 25382, МУ №13-7-2/2130, НД «Правила взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования».

6.3 Взятие материала на исследование

Взятие цельной периферической крови проводится в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов для выделения НК (7.1).

Кровь для анализа берут из яремной либо хвостовой вены крупного рогатого скота стерильной иглой с соблюдением правил асептики и антисептики, пользуясь отдельной иглой для каждого животного.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов крови определяются инструкциями по применению используемых наборов реагентов для выделения НК (7.1).

Образцы крови допускается транспортировать и хранить¹:

- при температуре от 20 °С 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! Не допускается замораживание цельной крови!

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам реагентов для выделения НК

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы реагентов, предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-ОПТИМА МАКС, ПРОБА-МЧ МАКС, ПРОБА-ЦИТО ВЕТ (таблица 2).

Допускается использование любых наборов реагентов, рекомендованных производителями для выделения ДНК из периферической крови животных с целью последующего исследования методом ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 2 – Наборы реагентов, валидированные для выделения ДНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов Провирусная ДНК вируса лейкоза КРС

Набор реагентов	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
ПРОБА-ОПТИМА МАКС (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496)	Цельная периферическая кровь	100
ПРОБА-МЧ МАКС (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391)	Цельная периферическая кровь	50
ПРОБА-ЦИТО ВЕТ (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, ДС № РОСС RU Д-RU.CC07.B.00279/20)	Цельная периферическая кровь	200

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объёме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. 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 4 образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

- 7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.2.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.
- 7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте пробирки/стрипы.
- 7.2.5 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 внесением в пробирки с реакционной смесью препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-ЦИТО ВЕТ встряхните пробирки с препаратом ДНК 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 ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК 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 ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.
- 7.2.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).
- 7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.2.9 Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.2.10 Установите все пробирки/стрипы в блок детектирующего амплификатора.
- 7.2.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении 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. 7.2.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ²	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

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

² – допускается хранение при температуре 10 °C

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S, стрипы с использованием дозирующего устройства ДТстрим

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. 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 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.3.3 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 необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-ЦИТО ВЕТ встряхните пробирки с препаратом ДНК 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 ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! При дозировании компонентов минеральное масло из состава набора реагентов не используется.

- 7.3.4 Установите пробирки с раствором Таq-полимеразы, с препаратами ДНК, 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.
- 7.3.5 Закройте стрипы.
- 7.3.6 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.3.7 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора.
- 7.3.8 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении 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. 7.3.7) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. 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 постаmplификационной 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.

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

7.4.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 6,0 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,3 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,

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

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца, «К–», «К+». Промаркированных пробирок/ необходимых лунок микропланшета – 6. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ для 7 (6+1) пробирок/лунок, т.е. 42 мкл ПЦР-буфера + 2,1 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ.

7.4.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.4.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. Закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов 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 с реакционной смесью препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-ЦИТО ВЕТ встряхните пробирки с препаратом ДНК 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 ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК 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 ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.

7.4.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К–», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).

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 ПЦР (7.4.15).

7.4.15 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении 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 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», «ДТлайт» (фасовки U, A)

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

7.5 Подготовка и проведение ПЦР. 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 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

7.5.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.5.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

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 необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-ЦИТО ВЕТ встряхните пробирки с препаратом ДНК 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 ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.5.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ, с препаратами ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также микропланшет для 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 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 ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

7.6 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А, пробирки, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*»)

ВНИМАНИЕ!

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

7.6.1 Тщательно перемешайте на микроцентрифуге-вортексе содержимое пробирок «Смесь для ПЦР Стрим» и «Полимераза ТехноТaq МАХ» и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

Примечание – Для проведения 384 определений одновременно используется четыре пробирки со смесью для ПЦР Стрим и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для проведения 192 определений одновременно используется две пробирки со смесью для ПЦР Стрим и одна пробирка с полимеразой ТехноТaq МАХ.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

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

7.6.3 Установите пробирки или планшеты с образцами ДНК на рабочий стол ДТстрим в соответствии с протоколом постановки.

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 2 постановки при условии 190 неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

7.6.4 Установите пробирки со смесью для ПЦР Стрим, полимеразой ТехноТaq МАХ и положительным контрольным образцом, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

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

- 7.6.5 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.6.6 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
- 7.6.7 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
- 7.6.8 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.
- 7.6.9 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении 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. 7.6.8) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 4.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

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

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 ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam (Провирусная ДНК BLV) Ср	Hex (ДНК КРС) Ср	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена провирусная ДНК вируса лейкоза КРС
Не указан	≤ 35	Не обнаружена провирусная ДНК вируса лейкоза КРС
Не указан	> 35 или не указан	Недостовверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	Не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Указан	Указан	Положительный результат Результаты постановки валидны

9.3 При анализе результатов необходимо учитывать значения Ср по каналу Hex: значение Ср больше 35 или его отсутствие при отсутствии положительного результата по каналу Fam интерпретируется программным обеспечением как недостаточное количество материала. Результат исследования для данного образца считается недостоверным (нд).

Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка 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 Фасовки S, U

10.1.2.1 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq MAX (фасовка U), в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

10.1.2.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq MAX (фасовка U) в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C не более 5 суток.

10.1.3 Фасовка A

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре до 25 °C внутри термоконтейнера не более 5 суток.

10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Фасовки S, U

10.2.1.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq MAX (фасовка U), 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.

10.2.1.2 Полимеразу ТехноТaq MAX (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.2 Фасовка A

Все компоненты набора реагентов 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 полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовки U, A), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
 - смесь для амплификации, смесь для ПЦР Стрим и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
 - полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовки U, A) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С 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 клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21.

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ 25382-82 Крупный рогатый скот. Методы лабораторной диагностики лейкозов

ГОСТ Р 52683-2006 Средства лекарственные для животных. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ Р 57175-2016 Требования к качеству и безопасности ПЦР-наборов, проведению исследований и испытаний с использованием метода ПЦР при идентификации целевых таксонов микрофлоры, растений и генетически модифицированных организмов

МУ 1.3.2569-2009 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности

МУ 13-7-2/2130-2000 Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота

НД № 13-5-2/1062 Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы

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

СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 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