

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.В. Малеев

«05» _____ 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «АЧС» предназначена для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus*) в биологическом материале, продуктах свиноводства и изделиях свиного происхождения методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus*) основан на экстракции ДНК из биологического материала совместно с ДНК экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО) и проведении амплификации полученной ДНК.

Для форм комплектации с электрофоретической детекцией, продукты амплификации детектируются с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для форм комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», результат амплификации ДНК вируса африканской чумы свиней регистрируется на канале для флуорофора **JOE**, результат

амплификации экзогенного ВКО регистрируется на канале для флуорофора **FAM**.

Положительный контроль экстракции содержит расклонированные инактивированные конструкции генома вируса АЧС в смеси с сывороткой крови.

Использование **экзогенного ВКО** позволяет контролировать основные этапы ПЦР-анализа (экстракцию ДНК и проведение амплификации ДНК).

Фермент UDG-TL (рекомбинантная урацил-ДНК-гликозилаза) применяется для снижения риска контаминации ампликонами. Фермент способен гидролизовать до 10^5 копий ампликона за 5 минут при комнатной температуре. Фермент полностью и необратимо инактивируется при нагревании до 80°C .

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

Аналитическая специфичность

Отсутствуют неспецифические реакции при тестировании образцов геномной ДНК свиньи и следующих микроорганизмов: цирковирс свиней 2-го типа; парвовирус свиней; вирус классической чумы свиней; вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней; вирус эпидемической диареи свиней; ротавирус; вирус болезни Ауэски; вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней; *Bordetella bronchiseptica*; *Brucella suis*; *Campylobacter jejuni*; *Clostridium perfringens*; *Chlamydia suis*; *Chlamydophila pecorum*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*; *Klebsiella pneumoniae*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis*; *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*; *Pasteurella multocida*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Dublin*; *Shigella flexneri*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus suis*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ДНК-сорб-В» вариант 50; «ПЦР-комплект» вариант 50 F; «ЭФ» вариант 200

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант 50 F

Форма 3: «ДНК-сорб-В» вариант 50; «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 4: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала, амплификацию ДНК вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus*) и электрофоретическую детекцию.

Форма 2 предназначена для проведения амплификации ДНК вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus*). Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК и электрофоретической детекции, рекомендованные Изготовителем.

Форма 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма 4 предназначена для проведения амплификации ДНК вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Формы 1 и 3 рассчитаны на экстракцию и проведение 50 реакций амплификации, включая контроли. Формы 2 и 4 рассчитаны на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для экстракции ДНК из клинического материала – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	50	1 флакон
Сорбент универсальный	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 50 проб, включая контроли.

«ПЦР-комплект» вариант 50 F – комплект реагентов для амплификации участка генома вируса африканской чумы свиней – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1 ASFV	0,3	1 пробирка
2,5x ПЦР-буфер blue	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
Фермент UDG-TL	0,06	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК ASFV	0,1	2 пробирки
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	4 пробирки
ВКО STI-550	0,6	1 пробирка

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

Реагенты «ПЦР-комплекта» вариант 50 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см.раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

«ЭФ» вариант 200 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – включает:

Реактив	Объем, мл	Кол-во
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	50	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	1,7	2 флакона

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участка генома вируса африканской чумы свиней с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT ASFV	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Flu	0,42	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
Фермент UDG-TL	0,06	1 пробирка
ПКО ДНК ASFV/ STI	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,6	2 пробирки
ВКО-FL	1,0	1 пробирка
ПКО ASFV	0,1	1 пробирка

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

Реагенты «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см.раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

- Работа должна проводиться согласно правилам 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.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах).

Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.

ВНИМАНИЕ! Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.

– Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

– Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.

– Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В» – при работе с формами комплектации, не включающими комплект для экстракции.
2. Ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
6. Вакуумный отсасыватель медицинский для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
7. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация

15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
16. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, Axugen Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
17. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемым комплектом реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

18. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
19. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия или аналогичный).
20. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
21. Программируемый амплификатор для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия); для пробирок объемом 0,2 мл (например, GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, США, или MaxyGene, Axugen, США) или другие, рекомендованные Изготовителем) – при работе с формами комплектации с электрофоретической детекцией.
22. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ/ iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, или другие, рекомендованные Изготовителем) – при работе с формами комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
23. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
25. Емкость для сброса наконечников.

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

26. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» – при работе с формой комплектации, не включающей комплект для электрофоретической детекцией.
27. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия, или аналогичная).
28. Источник постоянного тока с напряжением 150 - 460 В (например, «Эльф-4», «ДНК–Технология», Россия, или

- аналогичный).
29. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия, или аналогичный).
 30. Гель-документирующая система GelDoc-It (например, UVP, LLC. («ЮВиПи, ЛЛС»), США, или аналогичная).
 31. Аквадистиллятор.
 32. Холодильник от 2 до 8 °С для хранения продуктов амплификации.
 33. Микроволновая печь для плавления агарозы.
 34. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
 35. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
 36. Парафильм.
 37. Штатив для пробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичный).
 38. Отдельный механический или электронный дозатор переменного объема 10 - 40 мкл (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичный).
 39. Отдельный, шапочки, обувь халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 40. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат клинический материал (цельная кровь, плазма, сыворотка крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин) от латентно инфицированных и больных животных, патологический материал от павших животных (миндалины, селезенка, легкие, печень, лимфоузлы и др.), инфицированные культуры клеток, а также продукты свиноводства (мясо, шкуры и т.п.) и изделия свиного происхождения (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и т.п.).

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования

При отборе образцов материала, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды,

руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу.

Материал от каждого животного отбирают отдельными инструментами.

Взятие материала для исследования

- Цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови
Кровь для исследования отбирают в объеме 5 мл в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом Na в стандартной концентрации). Желательно использовать одноразовые системы взятия крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. Для получения сыворотки забор крови проводят в пробирку без антикоагулянта.
- Мазки со слизистой носоглотки и миндалин получают с помощью стерильного зонда, который вместе с материалом помещают в пробирку типа «Эппендорф» с 500 мкл стерильного физиологического раствора;
- фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.), продуктов свиного происхождения помещают в стерильный контейнер. Лимфоузлы берут целиком.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 7 дней;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала

Кровь используется без предварительной подготовки. Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 до 8 °С более 1 ч после ее взятия, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Переносят плазму в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Для получения **сыворотки** пробирки с кровью отстаивают при

комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.

Мазки со слизистой носоглотки и миндалин используются без предварительной подготовки.

Пробы тканей, органов и продуктов свиного происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции ДНК.

Культура клеток используется без предварительной подготовки.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов - при использовании формы комплектации с электрофоретической детекцией:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК,
- электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле,
- анализ и интерпретация результатов.

при использовании форм комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный контроль экстракции).

Для форм комплектации с электрофоретической детекцией, внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-550** и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки. Если исследуется **цельная кровь**, то в пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести по **50 мкл крови** и **50 мкл ОКО**, используя наконечники с фильтром. При исследовании других видов материала в пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести по **100 мкл материала**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В отдельную пробирку внести **30 мкл ПКО ДНК ASFV** и **270 мкл ОКО**, тщательно перемешать. **200 мкл** полученной смеси внести в пробирку положительного контроля (ПК) экстракции.

Для форм комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО-FL** и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

Если исследуется **цельная кровь**, то в пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести по **50 мкл крови** и **50 мкл ОКО**, используя наконечники с фильтром. При исследовании других видов материала в пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО** внести по **100 мкл материала**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ASFV**.

Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть в термостате 5 мин при температуре 65 °С, периодически перемешивая. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.

Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить

надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10-12 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить процедуру отмывки **раствором для отмывки 2**, удалить надосадочную жидкость полностью.

Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при 10-12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Раствор ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С или длительно при температуре не выше минус 16 °С.

Если пробы ДНК подвергались хранению или произошло взмучивание сорбента универсального, непосредственно перед постановкой ПЦР пробирки следует процентрифугировать при 10-12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге.

Аmplификация и детекция продуктов амплификации

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант 50 F и электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200 смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F с помощью приборов iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 3.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант 50 F (кроме полимеразы (TaqF) и фермента UDG-TL) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) и фермент UDG-TL хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант 50 F (кроме полимеразы (TaqF) и фермента UDG-TL) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) и фермент UDG-TL хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Форма 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F (кроме ПЦР-смеси-1-FRT ASFV, полимеразы (TaqF) и фермента UDG-TL) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ASFV, полимеразу (TaqF) и фермент UDG-TL хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до

минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ASFV хранить в защищенном от света месте. Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Форма 4. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F (кроме ПЦР-смеси-1-FRT ASFV, полимеразы (TaqF) и фермента UDG-TL) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ASFV, полимеразу (TaqF) и фермент UDG-TL хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ASFV хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «АЧС» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Амплификация

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Пробирку с ПЦР-смесью-1 *ASFV* перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1 *ASFV*, 2,5х ПЦР-буфер blue, полимеразу (TaqF), фермент UDG-TL из расчета на каждую реакцию:

- 5 мкл ПЦР-смеси-1 *ASFV*
- 10 мкл 2,5х ПЦР-буфера blue
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)
- 1 мкл фермента UDG-TL

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

В подготовленные для ПЦР пробирки под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.**

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) - внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *ASFV*.

Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин для устранения возможной контаминации с помощью фермента UDG-TL.

Б. Проведение амплификации

Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейках амплификатора достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Программа амплификации ASFV

«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems); Gradient Palm Cycler (Corbett Research)			
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	10 с	40	95 °С	10 с	40
	62 °С	10 с		62 °С	25 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		4 °С	хранение	

После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3).

Образцы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле (проводится в зоне 3 при помощи комплекта «ЭФ»)

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

А. Приготовление рабочих растворов и агарозного геля

Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – соединение, обладающее репродуктивной и острой токсичностью, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Агарозу для электрофореза ДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **3 см** друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Б. Порядок работы

Пробирки с продуктами амплификации последовательно

выставить в штатив, отобрать из-под слоя масла по **10–15 мкл пробы** и внести в лунки геля (необходимо использовать новый наконечник для каждой пробы). В **каждом** ряду лунок геля должен быть обязательно представлен **K+** и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

По завершении времени электрофореза (краситель при этом пройдет примерно половину длины геля – 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отмечая порядок нанесения проб, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены специальной маской или стеклянной пластиной!

Анализ и интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

Вирус африканской чумы свиней – 300 п.н.

Внутренний контрольный образец (ВКО STI-550) – 550 п.н.

В образце обнаружена ДНК **вируса африканской чумы**, если в соответствующей ему дорожке присутствует полоса на уровне **300 п.н.** большей или меньшей интенсивности, независимо от наличия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контрольного образца может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией ДНК вируса африканской чумы свиней.

В образце **не обнаружена ДНК вируса африканской чумы**, если в соответствующей ему дорожке отсутствует полоса на уровне **300 п.н.** и присутствует полоса внутреннего контроля **550 п.н.** большей или меньшей интенсивности.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы отсутствуют обе полосы, и 300 и 550 п.н. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Кроме полос **300 п.н.** и **550 п.н.** в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		полоса 300 п.н.	полоса 550 п.н.
ОК	Экстракция ДНК	Нет	Есть
ПК	Экстракция ДНК	Есть	Есть
К-	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Нет

Возможные ошибки:

1. В дорожке положительного контроля ПЦР (К+) и/или положительного контроля экстракции ДНК (ПК) отсутствует специфическая полоса 300 п.н. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК вируса африканской чумы свиней.
2. В дорожках отрицательных контролей (ОК, К-) присутствует специфическая полоса на уровне 300 п.н. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых

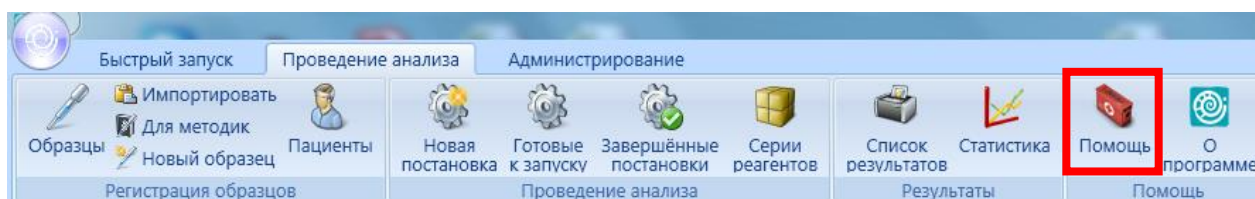
обнаружена ДНК вируса африканской чумы свиней, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

ВНИМАНИЕ! Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически, с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q- программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000 / Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.

Пробирку с **ПЦР-смесью-1-FRT ASFV** разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **ПЦР-смесь-1-FRT ASFV**, **ПЦР-буфер Flu**, **полимеразу (TaqF)** и **фермент UDG-TL** из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ASFV**
- **5 мкл ПЦР-буфера Flu**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**
- **1 мкл фермента UDG-TL**

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по **15 мкл** в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл проб ДНК**, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить **контрольные реакции**:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
- б) положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК ASFV/ STI**.

Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин для устранения возможной контаминации с помощью **фермента UDG-TL**.

Б. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.

- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** - 25 мкл. Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 3

Программа амплификации ASFV

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/Удерж. Темпы 1	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	10
	60	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	35
	55	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

Флуоресценцию измеряют при 55 °C на каналах **FAM/Green, JOE/Yellow**.

- Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Демек-мых**, выбрать функцию: **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции**. Для обоих каналов установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

В. Анализ результатов

Анализ полученных результатов можно проводить вручную, с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме, с использованием программного обеспечения FRT Manager.

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить **Threshold/Порог = 0.05**.
- В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации специфического участка ДНК вируса африканской чумы свиней (канал JOE/Yellow):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть активирована кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррек. уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.1**.
- В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе в таблице результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК вируса африканской чумы свиней, если для данной пробы значение Ct по каналу JOE/Yellow менее 20.

В образце **не обнаружена** ДНК вируса африканской чумы свиней, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow значения Ct отсутствуют (кривая флуоресценции не пересекает

пороговую линию), а по каналу FAM/Green определено значение Ct , не превышающее 31.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow получено значение Ct больше 20, а значение Ct по каналу FAM/Green не превышает 31.

В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ!!! Получение сомнительных результатов исследования может свидетельствовать о наличии внутрилабораторной контаминации. Рекомендуется провести деконтаминационные мероприятия перед проведением повторного ПЦР-исследования образца. В случае если повторно получен аналогичный результат (Ct по каналу JOE/Yellow более 20), требуется проведение исследования данного материала (или другого материала от этого животного) дополнительными методами и повторное взятие материала от этого животного для проведения ПЦР-исследования. В случае получения при повторном исследовании значения Ct по каналу JOE/Yellow менее 20, образец считать положительным.

ВНИМАНИЕ!!! Образцы изделий свиного происхождения (сосиски, колбасы, фарш и т.п.) могут содержать ДНК вируса АЧС в низкой концентрации. Поэтому при исследовании образцов таких изделий возможно получение значения Ct по каналу JOE/Yellow больше 20. В случае получения такого результата, требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Требуется параллельно провести исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения внутрилабораторной контаминации. В случае получения при повторном исследовании образца значения Ct по каналу JOE/Yellow больше 20 и отрицательного результата исследования смывов, образец считать положительным.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла (Ct) по каналу JOE/Yellow, и по каналу FAM/Green значение Ct также не определено (отсутствует) или превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции (см. таблицу 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
ОК	Экстракция ДНК	≤ 30	отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	≤ 30	≤ 25
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	≤ 30	≤ 30

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение Ct по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 4, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК вируса африканской чумы свиней.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу JOE/Yellow и/или для отрицательного контроля ПЦР (К-) по любому каналу определено значение Ct. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК вируса африканской чумы свиней, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.

Пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT ASFV разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT ASFV, ПЦР-буфер Flu, полимеразу (TaqF) и фермент UDG-TL из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ASFV
- 5 мкл ПЦР-буфера Flu
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)
- 1 мкл фермента UDG-TL

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл в пробирки для ПЦР.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК ASFV/ STI.

Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин для устранения возможной контаминации с помощью фермента UDG-TL.

Б. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета – расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
- Для прибора **iCycler iQ** в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**, в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

Задать программу амплификации:

Таблица 5

Программа амплификации ASFV

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	35
	55	25 с	FAM, JOE	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках

можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).

- Для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (ASFV.tmo) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы **ASFV** с заданной схемой планшета:

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

В. Анализ результатов

- Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
- Анализ результатов проводить по каналам FAM и JOE. Результаты обрабатывать для каждого канала по отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.
- В режиме анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне 10-20% от максимального уровня флуоресценции на последних циклах амплификации. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.
- Нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5) вывести на экран таблицу результатов со значениями *Ct*.

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК вируса африканской чумы свиней, если для данной пробы значение *Ct* по каналу JOE менее 20.

В образце **не обнаружена** ДНК вируса африканской чумы свиней, если для данной пробы по каналу JOE значения *Ct*

отсутствуют (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу FAM определено значение *Ct*, не превышающее 31.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы по каналу JOE получено значение *Ct* больше 20, а значение *Ct* по каналу FAM не превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ!!! Получение сомнительных результатов исследования может свидетельствовать о наличии внутрилабораторной контаминации. Рекомендуется провести деконтаминационные мероприятия перед проведением повторного ПЦР-исследования образца. В случае, если повторно получен аналогичный результат (*Ct* по каналу JOE более 20), требуется проведение исследования данного материала (или другого материала от этого животного) дополнительными методами и повторное взятие материала от этого животного для проведения ПЦР-исследования. В случае получения при повторном исследовании значения *Ct* по каналу JOE менее 20, образец считать положительным.

ВНИМАНИЕ!!! Образцы изделий свиного происхождения (сосиски, колбасы, фарш и т.п.) могут содержать ДНК вируса АЧС в низкой концентрации. Поэтому при исследовании образцов таких изделий возможно получение значения *Ct* по каналу JOE больше 20. В случае получения такого результата, требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Требуется параллельно провести исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения внутрилабораторной контаминации. В случае получения при повторном исследовании образца значения *Ct* по каналу JOE больше 20 и отрицательного результата исследования смывов, образец считать положительным.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение *Ct* по каналу JOE, и по каналу FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции (см. таблицу 6).

Таблица 6

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	≤ 30	отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	≤ 30	≤ 25
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	≤ 30	≤ 30

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение *Ct* по каналу JOE отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 6, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК вируса африканской чумы свиней.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу JOE и/или для отрицательного контроля ПЦР (К–) по любому каналу определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК вируса африканской чумы свиней, начиная с этапа экстракции ДНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов

LOT

Код партии



Использовать до

VER

Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель