

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 29 » октября

2020 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

**по применению тест-системы «РИНОКОР» для выявления возбудителя ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции**

### НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «РИНОКОР» предназначена для выявления ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (*Bovine herpes virus 1*) в биологическом материале от невакцинированных животных или животных, вакцинированных маркированными по гену гликопротеина Е (gE<sup>-</sup>) вакцинами, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС (крупного рогатого скота), далее - КРС, основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с ДНК **экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-V)**, амплификации полученной ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов

амплификации в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК -мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО-V	ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС ( <i>Bovine herpes virus 1</i> )

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

**Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)**

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл <sup>1</sup>
Мазки со слизистых. Суспензии внутренних органов	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 <sup>2</sup>
Сперма	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала.

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

### **Аналитическая специфичность**

Тест-система обнаруживает фрагмент гена гликопротеина Е вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (*Bovine herpes virus 1*). Специфическая активность тест-системы доказана при исследовании штаммов данного вируса: Оренбург, 4016, МВА, ТНЛ, Щапово.

Доказано отсутствие неспецифических реакций со штаммами и изолятами гетерологичных вирусов, возбудителей болезней КРС (вирус парагриппа 3 КРС, вирус лейкоза КРС, ротавирус, вирус диареи КРС) и геномной ДНК КРС.

### **ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ**

#### **Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F**

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

## СОСТАВ

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для амплификации участка ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT <i>BHV</i>	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	0,42	1 пробирка
TaqF-UDG	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>BHV</i> и STI	0,1	1 пробирка
К-	0,2	1 пробирка
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО-V	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта 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.

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>2</sup>. 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 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.

---

<sup>2</sup> Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- 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.

## **СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку<sup>3</sup>, биологический материал, а также 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.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом от 1,5 до 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

---

<sup>3</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

## **Предварительная подготовка исследуемого материала**

5. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
11. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, 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.
14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

## **Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

15. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп».
16. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

## **Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

17. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
  - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с

- прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
  19. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
  20. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
  21. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
  22. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
  23. 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, рекомендованный Изготовителем).
  24. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  25. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
  26. Емкость для сброса наконечников.

## **ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ**

Материалом для исследования служат: сперма (нативная или консервированная), мазки со слизистой оболочки влагалища, мазки со слизистой носовой полости, тканевой (аутопсийный) материал (легкие, селезенка, лимфоузлы).

При отборе образцов материала, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей и обсеменение объектов



внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями.

## **Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала**

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Сперму берут в объеме не менее 2 мл в стерильный контейнер.

Мазки со слизистой оболочки влагалища берут стерильным зондом с использованием стерильных гинекологических инструментов. Собранный материал помещают в пробирку, содержащую 500 мкл стерильного физиологического раствора.

Мазки со слизистой носовой полости получают с помощью стерильных зондов с ватными тампонами. После забора материала рабочую часть зонда с ватным тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают для того, чтобы крышка пробирки плотно закрылась. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты тканей и органов) помещают в стерильный контейнер.

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

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

## **Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК**

Образцы спермы смешивают в соотношении 1:4 с физиологическим раствором. Для экстракции ДНК используют 100 мкл полученной смеси.

Мазки со слизистой оболочки влагалища и мазки со слизистой носовой полости используют без предварительной подготовки.

Тканевой материал объемом 0,2-0,3 см<sup>3</sup> (200-300 мкл) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых

ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят ~10 % (v/v) суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12 тыс об/мин в течение 2 минут. Для экстракции ДНК используют 100 мкл надосадочной жидкости. Допускается хранение гомогенатов тканей при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

### **Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп»**

**Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО-V**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО-V**, внести по **100 мкл проб**, используя наконечники с фильтром.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель с и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть **осадок**,

переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

## **Аmplификация и детекция продуктов амплификации**

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

### **А. Подготовка проб для проведения ПЦР**

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

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-1-FRT *BHV*, ПЦР-буфер-С, TaqF-UDG, из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *BHV*;
- 5 мкл ПЦР-буфера-С;
- 0,5 мкл TaqF-UDG.

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

В подготовленные для ПЦР пробирки, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

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

## **Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с помощью прибора CFX96 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 3.

## **В. Анализ и 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) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*C<sub>t</sub>*). Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение *C<sub>t</sub>*, не превышающее 37.

В образце **не обнаружена** ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE не определено (отсутствует) значение *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение *Ct*, не превышающее 33.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы значение *Ct* превышает 37 по каналу для флуорофора JOE, а по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* не превышает 33. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (*Ct*) не определено (отсутствует) или превышает 37, и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 33. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

Результат считается **достоверным**, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. таблицу 3).

Таблица 3

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования**

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

### **Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение  $Ct$  по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 3, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, JOE и/или для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE 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 специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 15 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.

**Хранение.** «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1-FRT *BHV*, ПЦР-буфера-С и TaqF-UDG. ПЦР-смесь-1-FRT *BHV*, ПЦР-буфер-С и TaqF-UDG хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *BHV* 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 указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «РИНОКОР» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: [obtk@pcr.ru](mailto:obtk@pcr.ru)<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, 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 (Rotor-Gene Q) / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000.

#### А. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.



Поместить подготовленные для проведения ПЦР 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 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 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 4

### Программа амплификации Rinocor

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	10 с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10 с	–	40
	55	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

- Нажать 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 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге демекции**. Для обоих красителей 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 роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как **Unknown/Образец**.

## **Б. 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 ДНК 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**.
- 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 = 0.05**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

**Анализ результатов амплификации специфического участка ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС (*Bovine herpes virus 1*) (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**.
- 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**.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США)

#### А. 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** для создания схемы планшета 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** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого 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). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**.

Задать программу амплификации.

Таблица 5

### Программа амплификации Rinocor

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	5
	60	25с		
	72	25 с		
3	95	10 с	–	40
	55	25 с	FAM, JOE	
	72	25 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола 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** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне 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** (Rinocor.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 **Rinocor** 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.

## **Б. Анализ результатов**

### **Анализ результатов амплификации ДНК ВКО (канал FAM):**

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу FAM. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- 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**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала FAM-490. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

**Анализ результатов амплификации ДНК вируса инфекционного ринотрахеита КРС (*Bovine herpes virus 1*) (канал JOE):**

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу JOE, отключив кнопку FAM. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала JOE-530. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

### АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

#### А. Проведение амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала

- Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
- В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run.../Experiment...**). Нажать **OK**.
- В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25** мкл.

Таблица 6

#### Программа амплификации Rinocor

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	5
	65	25 с	–	
	72	25 с	–	
3	95	10 с	–	40
	65	25 с	FAM, HEX	
	72	25 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec** (см. рис. ниже). Нажать **OK**.



1	95,0 C for 15:00
→ 2	95,0 C for 0:10
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
3	60,0 C for 0:25
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
4	72,0 C for 0:25
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
← 5	GOTO 2 , 4 more times
→ 6	95,0 C for 0:10
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
7	55,0 C for 0:25
	+ Plate Read
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
8	72,0 C for 0:25
	Slow Ramp Rate to 2,5 C per second
← 9	GOTO 6 , 39 more times
	END

- Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new...** В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.
- Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
- Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

**ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

- Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

## **Б. Анализ результатов**

- Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.
- В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.
- Для каждого канала установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне 5-10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала образца K+. 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.

Примечание – Чтобы выделить график образца «K+» (или другого желаемого образца), установить курсор в схеме планшета либо в таблице результатов.

## 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