

«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

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «PPCC» для выявления и генотипирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «PPCC» предназначена для выявления РНК и генотипирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПРИНЦИП МЕТОД

Метод выявления РНК вируса PPCC основан на экстракции РНК из биологического материала совместно с РНК **экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО)**, проведении реакции обратной транскрипции РНК, амплификации полученной кДНК и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени». Результат амплификации кДНК вируса PPCC европейского генотипа регистрируется по каналу для флуорофора **JOE**, результат амплификации кДНК вируса PPCC американского генотипа – регистрируется по каналу для флуорофора **ROX**, результат амплификации кДНК экзогенного ВКО – регистрируется по каналу для флуорофора **FAM**. Использование **экзогенного ВКО** позволяет контролировать

основные этапы ПЦР-анализа (экстракцию РНК, реакцию обратной транскрипции РНК и амплификацию кДНК).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

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

Таблица 1

Вид исследуемого материала	Объем экстракции, мкл	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл ¹
Плазма, сыворотка крови	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 ³
Суспензии внутренних органов и тканей				1x10 ³
Сперма				5x10 ³

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

Аналитическая специфичность

Отсутствуют неспецифические реакции при тестировании образцов геномной ДНК свиньи и ДНК/РНК следующих микроорганизмов: цирковирс свиней 2 типа; парвовирус свиней; вирус классической чумы свиней; вирус африканской чумы свиней; вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней; вирус эпидемической диареи свиней; ротавирус; вирус болезни Ауэски; *Mycoplasma hyopneumonia*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*; *Brucella suis*; *Chlamydia suis*; *Chlamydophila pecorum*; *Haemophilus parasuis*; *Lawsonia intracellularis*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Bordetella bronchiseptica*; *Pasterella multocida*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*; *Escherichia coli*;

¹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала.

Campylobacter jejuni; *Salmonella choleraesuis*; *Salmonella Dublin*, *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus suis*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплект реагентов для экстракции РНК, рекомендованный Изготовителем.

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК вируса РРСС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT PRRSV	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIv)	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	0,015	1 пробирка
ПКО кДНК PRRSV / STI	0,2	1 пробирка
К-	0,2	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	0,12	5 пробирок

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.
- 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 фильтром². 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.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При

² Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра

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 РНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп».
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция и амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

3. 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.
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

8. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия) или iCycler iQ/iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, или другие, рекомендованные Изготовителем).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: плазма, сыворотка крови, сперма, тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы павших животных, мертворожденных, мумифицированных и абортированных плодов (миндалины, селезенка, легкие и др.), плацента).

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3 %-ным раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Взятие крови для получения сыворотки проводится в пробирку без антикоагулянта.

Сперму берут в объеме не менее 1 мл в стерильные пробирки.

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

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °С – не

более 48 часов, замораживание цельной крови не допускается. Допускается хранение остальных видов 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 РНК

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 стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

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.

Тканевой материал объемом 0,2-0,3 см³ (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 отстаивают при комнатной температуре в течение 2-3 мин и 100 мкл верхней фазы суспензии используют для экстракции РНК. Допускается хранение гомогенатов при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 месяца.

К образцу спермы добавляют 4 объема стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивают и центрифугируют 5 мин при 6500 g (10 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия). Для экстракции РНК используют 100 мкл пробы.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция РНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп»

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные—пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

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

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87-рес** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-рес** 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, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.

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

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

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель 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 **200 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 **200 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 РНК. Пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР.

Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

ОТ-ПЦР и детекция продуктов амплификации

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

А. Подготовка проб для проведения ОТ-ПЦР

Разморозить пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT PRRSV**, перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT PRRSV**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**,

полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и RT-G-mix-2 из расчета на каждую реакцию:

- 10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *PRRSV*
- 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT
- 0,5 мкл полимеразы (TaqF)
- 0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)
- 0,25 мкл RT-G-mix-2

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 РНК, 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 кДНК *PRRSV* / *STI*.

Б. Проведение ОТ-ПЦР и детекции продуктов амплификации

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

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

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) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** РНК вируса РРСС европейского генотипа, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение *Ct*, не превышающее 37.

В образце **обнаружена** РНК вируса РРСС американского генотипа, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение *Ct*, не превышающее 37.

В образце **не обнаружена** РНК вируса РРСС европейского и американского генотипа, если для данной пробы по каналам для флуорофоров JOE и ROX значения *Ct* отсутствуют (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу для флуорофора FAM определено значение *Ct*, не превышающее 33.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы по каналу для флуорофора JOE и/или ROX получено значение *Ct* больше 37, а значение *Ct* по каналу для флуорофора FAM не превышает 33. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. В случае повторения результата или получения значения *Ct* менее 37 считать, что РНК вируса РРСС обнаружена.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналам для флуорофоров JOE и ROX значение порогового цикла (*Ct*) не определено (отсутствует), и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 33. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция РНК	≤ 33	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	≤ 30	≤ 30	≤ 30

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров JOE и ROX отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 2, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК вируса РРСС европейского и американского генотипа.
2. Для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) по каналам для флуорофоров JOE и ROX и/или для отрицательного контроля ПЦР (К-) на любом из каналов определено значение порогового цикла (C_t). 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 РНК вируса РРСС европейского и американского генотипа, начиная с этапа экстракции РНК.

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. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *PRRSV*, ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMIv) и RT-G-mix-2. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *PRRSV*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до

минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *PRRSV* 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.

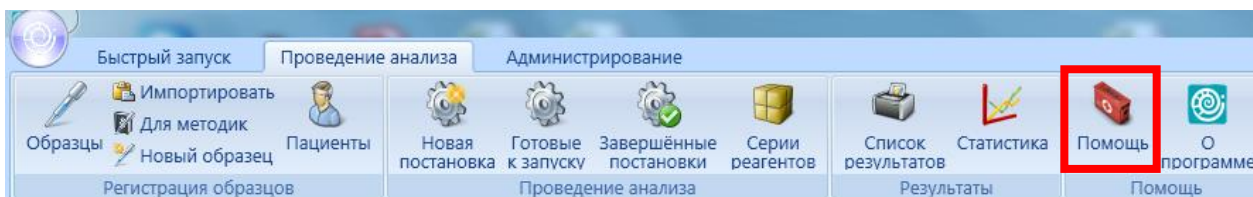
Рекламации на качество тест-системы «PPCC» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru³.

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ ОТ-ПЦР 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 ОТ-ПЦР 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.

- 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 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 3

Программа амплификации PRRSV

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	63	20 с	–	
	72	10 с	–	
4	95	10 с	–	40
	63	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	10 с	–	

- 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 всех каналов установить параметры **Min**

Reading/Миним. Сигнал – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10 FI. Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.

- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперименту 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 кДНК 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** (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 кДНК вируса РРСС европейского генотипа (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**.
- 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** (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 кДНК вируса РРСС американского генотипа (канал ROX/Orange):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange, 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 СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.05**.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

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

А. Проведение ОТ-ПЦР 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**, **JOE** и **ROX**. 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**, **JOE** и **ROX**. 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 4

Программа амплификации PRRSV

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	5
	63	25 с	–	
	72	25 с	–	
4	95	10 с	–	40
	63	25 с	FAM, JOE, ROX	
	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 4 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (PRRSV.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 **PRRSV** 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

- 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 проводится по каналам FAM, JOE, ROX. Результаты обрабатывают 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 5-10 % 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.
- Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5).

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель