

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391772 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.27

(51) Int. Cl. C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.16

(54) СПОСОБ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ПАРВОВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 3 ТИПА

(31) 63/126,939; 63/211,607

(72) Изобретатель:
Амини Бавил Олиаи Самад (US)

(32) 2020.12.17; 2021.06.17

(33) US

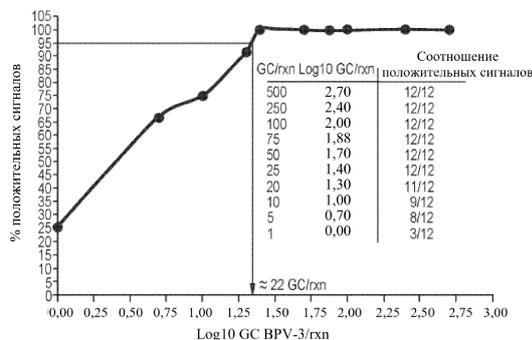
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(86) PCT/US2021/063668

(87) WO 2022/133005 2022.06.23

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(57) В настоящем изобретении представлены комбинации праймеров и зондов для обнаружения ДНК, кодирующей геномную ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3), в экстрагированной ДНК тестируемого образца. Также представлен внутренний положительный контроль.



A1

202391772

202391772

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578468EA/032

СПОСОБ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ПАРВОВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 3 ТИПА

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/126939, поданной 17 декабря 2020 г., и предварительной заявке на патент США № 63/211607, поданной 17 июня 2021 г., которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей, как если бы они были полностью изложены в данном документе.

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием A-2741-WO-PCST_ST25.txt, созданного 9 октября 2021 г., размер которого составляет 6 кБ. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области изготовления биофармацевтических препаратов. В частности, в настоящем изобретении представлен ПЦР-анализ для качественного или количественного обнаружения загрязнения геномной ДНК парвовирусом крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца с необязательным внутренним контролем.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изготовление терапевтических биологических лекарственных средств с использованием процессов культивирования клеток сопряжено с внутренне присущим риском передачи вирусных загрязнителей. Такие загрязнители могут поступать из многих источников, включая материалы и оборудование, использование реагентов животного происхождения в ходе изготовления, а также в результате загрязнения производственной системы из-за сбоев в процессе GMP. Исходные материалы животного происхождения, такие как бычья сыворотка (FBS), иногда используются как компонент процессов изготовления с использованием клеточных культур и являются одним из основных источников загрязнения вирусами крупного рогатого скота в процессе биопроизводства. Для удовлетворения требований регулирующих органов системы здравоохранения по обеспечению отсутствия занесенных агентов в биотерапевтических препаратах, полученных из клеток млекопитающих, биопроизводителям необходимо предпринимать шаги по обнаружению, удалению и/или инактивации вирусного загрязнения. Перед использованием исходные материалы можно тестировать на предмет вирусного загрязнения и предпринять меры по исправлению ситуации. В зависимости от изготавливаемой биологической молекулы в процесс последующей очистки могут быть добавлены специальные стадии инактивации и удаления вирусов для обеспечения вирусной безопасности биотерапевтических препаратов.

Семейство Parvoviridae включает вирусы с однопитевой ДНК (ssDNA) с

небольшими безоболочечными капсидами с икосаэдрической симметрией $T=1$, известные под общим названием парвовирусы. Их диаметр находится в диапазоне 18-26 нм. Вирусный капсид содержит геном размером ~ 5 т. о., который кодирует два основных белка - неструктурный (NS) и структурный капсидный (VP) белок. Вирусы семейства Parvoviridae инфицируют широкий спектр хозяев и делятся на два подсемейства: Parvovirinae и Densovirinae, которые инфицируют позвоночных и членистоногих хозяев соответственно.

Парвовирус крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) относится к подсемейству Parvovirinae, роду Erythroparvovirus (вид Ungulate erythroparvovirus 1). Хотя известно, что BPV-3 инфицирует крупный рогатый скот, его патогенез и клиническое проявление остаются неясными.

В соответствии с требованиями к тестированию, изложенными в Своде федеральных нормативных актов (CFR, раздел 9, часть 113), наличие или отсутствие определенных вирусов в ингредиентах животного происхождения, используемых при получении биологических препаратов, требует оценивания путем инкубации исходных материалов животного происхождения на специфических индикаторных клетках, которые впоследствии наблюдают на предмет индуцированных вирусом цитопатических эффектов и тестируют с помощью гемадсорбции или флуоресценции антител. Среди парвовирусов крупного рогатого скота BPV-1 способен реплицироваться в по меньшей мере одной из выбранных индикаторных клеточных линий и может быть обнаружен с помощью теста согласно части 113 раздела 9 CFR.

Однако на сегодняшний день не выявлено перmissive клеточной линии, поддерживающей репликацию BPV-3, и поэтому его невозможно обнаружить с помощью обычного тестирования согласно части 113 раздела 9 CFR. Несмотря на то, что BPV-3 был обнаружен с помощью секвенирования нового поколения (NGS) несколько лет назад, он остается новым вирусом с ограниченной доступной информацией. При традиционном тестировании на вирус с использованием клеточных культур отсутствует возможность поддержания репликации для BPV-3, поэтому молекулярно-биологические анализы являются важным альтернативным способом обнаружения геномной ДНК BPV-3. Влияние BPV-3 на изготовление с использованием клеточных культур остается невыясненным. Существует потребность в быстром и специфическом способе обнаружения наличия или отсутствия геномной ДНК BPV-3 в исходных материалах, таких как фетальная бычья сыворотка (FBS) и/или необработанные не соответствующие GMP образцы собранного материала, содержащие FBS, полученные при изготовлении с использованием клеточных культур. Описанное в данном документе изобретение удовлетворяет данную потребность.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлена композиция, содержащая олигонуклеотиды, выбранные из групп, состоящих из а) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO:

3; b) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; c) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; d) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и e) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15; f) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; g) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и h) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления композиция необязательно содержит вторую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления композиция содержит олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления композиция содержит первую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и вторую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В настоящем изобретении представлен реагент для обнаружения ДНК, кодирующей геномную ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3), в экстрагированной ДНК тестируемого образца, выбранный из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; b) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15; f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В связанном

варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и/или нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), либо гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей структурный капсидный (VP) белок и/или неструктурный (NS) белок парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в тестируемом образце. В одном варианте осуществления реагент используется в комбинации с комбинацией праймеров внутреннего положительного контроля. В одном варианте осуществления реагент содержит SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В настоящем изобретении представлен реагент для применения в качестве комбинации праймеров и зондов внутреннего положительного контроля в анализе для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащий комбинацию праймеров и зондов. В связанном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В связанном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления реагент содержит SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В настоящем изобретении представлена комбинация праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3). В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов выбрана из групп, состоящих из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15; ф) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; г) комбинации праймеров и

зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и/или нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), либо гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей структурный капсидный (VP) белок и/или неструктурный (NS) белок парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в тестируемом образце. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющая последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, применяется в комбинации с комбинацией праймеров и зондов, используемой для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в тестируемом образце, как описано выше. В связанном варианте осуществления SEQ ID NO: 20 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В связанном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлена комбинация праймеров и зондов для обнаружения ДНК, кодирующей геномную ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащая SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, содержащей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце, а SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлен набор для обнаружения загрязнения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащий комбинацию праймеров и зондов, которая обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей BPV-3, выбранную из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID

NO: 5 и SEQ ID NO: 6; c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28; и необязательно комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления набор содержит комбинацию праймеров и зондов, которая обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей BPV-3, выбранную из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; b) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15; f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28; и комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В настоящем изобретении представлен способ определения наличия или отсутствия геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца, предусматривающий 1) реакционную смесь, содержащую тестируемый образец, положительный контроль, плазмидную ДНК положительного контроля BPV-3_IPC, реагенты для амплификации нуклеиновых кислот, комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце, и комбинацию праймеров и зондов, селективную для последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, выбранную из

группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, где SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, где SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; и ж) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, где SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; 2) осуществление в отношении реакционной смеси методики количественной ПЦР с получением копий последовательности-мишени, 2) осуществление в отношении реакционной смеси методики количественной ПЦР с получением копий последовательности-мишени, 3) измерение любого увеличения сигнала флуоресценции, где увеличение сигнала флуоресценции указывает на присутствие геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в тестируемом образце. В одном варианте осуществления флуоресцентный репортерный краситель представляет собой 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), а нефлуоресцентный гаситель представляет собой нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), или гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ). В одном варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно включает один или несколько отрицательных контролей экстракции, контролей без матрицы, положительных контролей экстракции, положительных контролей и/или контролей ингибирования. В одном варианте осуществления чувствительность или аналитический предел обнаружения составляет 22 геномные копии на реакцию. В одном варианте осуществления предел обнаружения образца составляет 25 геномных копий на реакцию. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, обеспечивает обнаружение геномной ДНК, кодирующей неструктурный (NS) белок и/или структурный капсидный (VP) белок

парвовируса крупного рогатого скота 3 типа. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, обеспечивает амплификацию фрагмента размером 144 п. о. В другом варианте осуществления комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, содержит комбинацию SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В другом варианте осуществления способ дополнительно предусматривает комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля. В связанном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В связанном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В связанном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлен способ количественного определения от $1E3$ до $1E8$ геномных копий геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в ПЦР-реакции, предусматривающий 1) реакционную смесь, содержащую экстрагированную ДНК тестируемого образца, положительный контроль, плазмидную ДНК положительного контроля BPV-3_IPC, реагенты для амплификации нуклеиновых кислот, комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце, и комбинацию праймеров и зондов, селективную в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, выбранную из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID

NO: 15, где SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, где SEQ ID NO: 22 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, где SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; и h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, где SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; 2) осуществление в отношении реакционной смеси методики количественной ПЦР с получением копий последовательности-мишени и 3) измерение любого увеличения сигнала флуоресценции. В одном варианте осуществления предел обнаружения (LOD95%) способа составляет 27 геномных копий геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа на реакцию с 95% доверительным интервалом от 22 до 34 геномных копий на реакцию. В одном варианте осуществления линейность способа характеризуется коэффициентом корреляции (R^2) $\geq 0,98$ и эффективностью ПЦР-амплификации в пределах 90-110%. В одном варианте осуществления способ характеризуется величиной сходимости, которая представляет собой % CV количества, который равняется или меньше 25%. В одном варианте осуществления способ характеризуется величиной промежуточной прецизионности, которая представляет собой % CV количества, который равняется или меньше 30%. В одном варианте осуществления способ характеризуется величиной точности в пределах $\pm 30\%$ от принятого эталонного значения (ST) во всем динамическом диапазоне анализа. В одном варианте осуществления способ характеризуется пределом количественного определения, который представляет собой % CV количества для сходимости при $\leq 25\%$, промежуточной прецизионности при $\leq 30\%$ и критерия приемлемости для точности в пределах $\pm 30\%$ от ожидаемого стандартного эталонного значения. В другом варианте осуществления способ характеризуется робастностью с процентным CV количества для сходимости $\leq 25\%$, промежуточной прецизионности $\leq 30\%$ и точности среднего значения количества для тестируемого условия с комбинированной матрицей $\pm 30\%$ от среднего значения количества для оптимизированного условия. В другом варианте осуществления способ предусматривает одно или несколько из контроля без матрицы, положительного контроля, отрицательного контроля экстракции, положительного контроля экстракции, контроля ингибирования, внутреннего положительного контроля и стандарта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Пробит-анализ, применяемый для определения ALOD в qPCR BPV-3 с 95% вероятностью (LOD95%).

Фигура 2. График POD и результаты анализа LOD95%.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как описано в данном документе, был разработан способ качественной ПЦР в режиме реального времени для обнаружения потенциального загрязнения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированных тестируемых образцах. Квалификационные параметры, в том числе специфичность, предел обнаружения (LOD), робастность и сходимость, использовались для тестирования и подтверждения эффективности анализа.

В анализе применяют оптимизированные комбинации праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца. Праймеры для ПЦР BPV-3 обеспечивают амплификацию консервативных областей в генах, кодирующих неструктурный (NS) белок и/или структурный капсидный (VP) белок BPV-3, в геноме BPV-3. За информацией обращались к "Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis", РЕДАКЦИЯ: 21 декабря 2016 года, и ее учитывали при планировании и разработке анализа.

В настоящем изобретении представлены олигонуклеотидные комбинации праймеров и зондов, которые можно применять в способах обнаружения, как, например, в методиках количественной полимеразной цепной реакции (qPCR), для обнаружения ДНК, кодирующей геномную ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3), и для применения в способах определения наличия или отсутствия BPV-3 в экстрагированной ДНК тестируемого образца.

Как используется в данном документе, "олигонуклеотиды" представляют собой короткие одонитевые синтетические молекулы ДНК или РНК длиной менее 200 нуклеотидов, как правило, в диапазоне длины 13-25 нуклеотидов. Олигонуклеотиды связываются со своим комплементарным олигонуклеотидом, образуя дуплекс. Вследствие этого олигонуклеотиды широко используются в различных сферах применения, где требуется обнаружение наличия или отсутствия специфических последовательностей ДНК или РНК. В частности, олигонуклеотиды являются применимыми в качестве праймеров для применения в полимеразных цепных реакциях (ПЦР). Способы синтеза олигонуклеотидов известны из уровня техники, оборудование для получения олигонуклеотидов является коммерчески доступным, и существуют поставщики услуг, которые будут изготавливать олигонуклеотиды по индивидуальному заказу. Олигонуклеотиды также могут быть получены в результате распада более крупных молекул нуклеиновых кислот или олигонуклеотидов, встречающихся в природе, таких как микроРНК.

В настоящем изобретении представлена композиция, содержащая олигонуклеотиды, выбранные из групп, состоящих из а) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; б) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; в) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; д)

олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; е) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, f) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, g) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, и h) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления композиция содержит олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления композиция необязательно содержит вторую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательности под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, в комбинации с одной или несколькими комбинациями праймеров и зондов, упомянутыми выше. В одном варианте осуществления композиция содержит олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления композиция содержит первую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и вторую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 могут содержать по меньшей мере один флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и/или по меньшей мере один нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют по меньшей мере один флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и по меньшей мере один нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель, выбранный из 6-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM) или 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеина (VIC), на 5'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-

карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В одном варианте осуществления гаситель выбран из нефлуоресцентного гасителя, связывающегося с малой бороздкой (MGB-NFQ), и гасителя флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 имеют нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 22 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлен реагент для применения в обнаружении геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3). Данный реагент

можно применять для определения наличия или отсутствия геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца.

Как используется в данном документе, "тестируемый образец" означает любой образец экстрагированной ДНК, для которого необходимо определить наличие или отсутствие BPV-3. Может быть известно или предполагаться, что тестируемый образец содержит BPV-3. Тестируемые образцы могут быть получены из исходных материалов, таких как используемые при изготовлении биотерапевтических препаратов. Исходные материалы включают те, о которых известно или предполагается, что они имеют животное происхождение или содержат компоненты животного происхождения, в частности происходят от крупного рогатого скота, или известно или предполагается, что они были в контакте с другими материалами животного происхождения, в частности от крупного рогатого скота, в том числе такие исходные материалы, как фетальная бычья сыворотка и фетальная телячья сыворотка. Тестируемые образцы также могут быть получены из среды для культивирования клеток, в частности среды для культивирования клеток, содержащей фетальную бычью или фетальную телячью сыворотку. Среда может быть получена до или во время культивирования клеток или после сбора среды для культивирования клеток в результате процесса культивирования клеток. В ходе культивирования клеток можно отбирать периодические образцы, и это может производиться несколько раз в день, ежедневно, в критические моменты в ходе культивирования, в частности, в начале и при сборе культуры. Тестируемые образцы также могут быть получены из клеточных линий, используемых при изготовлении биотерапевтических препаратов, в том числе клеток и клеточных линий, происходящих от крупного рогатого скота. Тестируемые образцы также могут быть получены из образцов, отобранных в ходе последующей обработки, например, из элюата, полученного на стадиях последующей очистки, образцы могут быть отобраны из лекарственной субстанции и из готовой лекарственной формы.

В настоящем изобретении представлен реагент для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, выбранный из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления реагент необязательно содержит комбинацию

праймеров и зондов внутреннего положительного контроля. В одном варианте осуществления реагент дополнительно содержит комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля содержит нуклеиновую кислоту под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления реагент представляет собой комбинацию праймеров и зондов, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, и комбинацию праймеров и зондов, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 18 может содержать по меньшей мере один флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и/или по меньшей мере один нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В связанном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 18 имеют по меньшей мере один флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и по меньшей мере один нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В связанном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 имеют флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 имеют флуоресцентный репортерный краситель, выбранный из 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) или 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеина (VIC), на 5'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 15 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 18 имеют нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В одном варианте осуществления гаситель выбран из нефлуоресцентного гасителя, связывающегося с малой бороздкой (MGB-NFQ), и гасителя флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 имеют нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3 имеет гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель

флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлены комбинации праймеров и зондов, которые нацеливаются на структурный капсидный (VP) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 3535-3554 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 3667-3643 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 3571-3588 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 2, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 1734-1716 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 1618-1645 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 1665-1678 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 2862-2878 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 2963-2938 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967,

и зонд, который нацеливается на положения 2902-2930 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 21, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 22. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 3051-3068 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 3134-3114 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 3079-3102 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 24, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 25. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 3061-3079 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 3140-3122 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 3081-3103 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 27, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 28.

В настоящем изобретении представлены комбинации праймеров и зондов, которые нацеливаются на неструктурный (NS) белок и структурный капсидный (VP) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 2190-2209 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 2256-2236 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 2213-2226 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 5, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6.

В настоящем изобретении представлены комбинации праймеров и зондов, которые нацеливаются на неструктурный (NS) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на

положения 1331-1352 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 1474-1453 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 1377-1391 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 1453-1474 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 1562-1539 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 1507-1522 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления реагент для обнаружения геномной ДНК BPV-3 в образце применяется в комбинации с комбинацией праймеров внутреннего положительного контроля. В настоящем изобретении представлена комбинация праймеров и зондов для обнаружения ДНК, кодирующей геномную ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в экстрагированной ДНК тестируемого образца в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, содержащей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В настоящем изобретении представлена комбинация праймеров и зондов для обнаружения ДНК, кодирующей геномную ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащая SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, содержащей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце, а SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлена комбинация праймеров и зондов для

обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3). В одном варианте осуществления представлена комбинация праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, как описано выше, где комбинация праймеров и зондов выбрана из групп, состоящих из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15; ф) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и з) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления представлена комбинация праймеров и зондов, где SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В одном варианте осуществления представлена комбинация праймеров и зондов, где одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбокCIFлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и/или нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), либо гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей структурный капсидный (VP) белок и/или неструктурный (NS) белок парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в тестируемом образце.

В одном варианте осуществления представлена комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца в комбинации с комбинацией праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, где комбинация праймеров и зондов имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В одном варианте

осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

Также представлена комбинация праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащая SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, содержащей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце, а SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В настоящем изобретении представлен способ определения наличия или отсутствия геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца. Способ предусматривает реакционную смесь, содержащую экстрагированную ДНК тестируемого образца, реагенты для амплификации нуклеиновых кислот, комбинацию праймеров и зондов, селективную в отношении геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, и необязательно комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля; осуществление в отношении реакционной смеси методики ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с получением копий последовательности-мишени, измерение любого увеличения сигнала флуоресценции, где увеличение сигнала флуоресценции указывает на присутствие геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в тестируемом образце. Реагенты, описанные в данном документе, также можно применять для количественного определения числа геномных копий BPV-3 в тестируемом образце, например, для определения уровня положительности, вирусной нагрузки, с точки зрения количества вирусных геномов на мл тестируемого образца.

Реакционная смесь содержит компоненты, необходимые для проведения методики количественной ПЦР. Коммерчески доступными являются стандартные мастер-миксы, смеси компонентов и т. п. - универсальный мастер-микс для ПЦР 2X TAQMAN[®] (Applied Biosystems). Компоненты обычно включают dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP или dUTP), магний, ДНК-полимеразу TAQ, буферы и загрузочные красители, если это требуется для используемого ПЦР-термоциклера. Другие включают супермикс для qPCR PerfeCTa с низким содержанием ROX от Quantabio (Quantabio, Беверли, Массачусетс). Существует также целый ряд коммерчески доступных термоциклеров. Специалисты в данной области смогут определить, какой из них соответствует их потребностям.

ПЦР в режиме реального времени или qPCR представляет собой методику, требующую относительно небольших количеств ДНК, кДНК или РНК, которые могут быть определены количественно, и облегчающую отслеживание хода ПЦР в режиме

реального времени по мере протекания реакции. В данной методике ПЦР используются комбинации олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидных зондов с двойной меткой. Зонды выступают в качестве репортера, в случае амплификации они накапливаются с каждым циклом ПЦР-реакции.

Специфичное обнаружение амплифицированного продукта может быть выполнено с использованием одного или нескольких олигонуклеотидных зондов, меченных репортерным флуоресцентным красителем и красителем-гасителем. Такие зонды известны специалистам в данной области и являются коммерчески доступными, в том числе молекулярные маяки, зонды с двойной меткой, зонды для FRET (резонансного переноса энергии флуоресценции) и зонды Scorpion[®]. Олигонуклеотидные зонды могут быть помечены с помощью репортерного флуоресцентного красителя и одного или нескольких красителей-гасителей. Примеры флуоресцентных репортерных красителей включают 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM или 6-FAM), 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC), TET[™], HEX[™], JOE, Cy[®] 3, Cy[®] 5, Cy[®] 5.5, TAMRA, ROX[™], LC красный 610, тexasский красный[®], LC640, SUN[™], MAX[™], ATTO[™] 550, ATTO 647[™], Cal Fluor золотой 540 и оранжевый 560, TxRd (сульфородамин 101-X), Quasar 570 и 670. Примеры гасителей флуоресценции включают средство, связывающееся с малой бороздкой (MGB-NFQ), ZEN-IB, Black Hole Quencher[®] (BHQ 1, 2 и 3), TAMRA, Iowa Black[®] FQ и RQ.

Например, зонды с двойной меткой могут быть помечены с помощью одного или нескольких флуоресцентных репортерных красителей на 5'-конце, которые флуоресцируют в присутствии комплементарной мишени, и одного или нескольких нефлуоресцентных гасителей на 3'-конце. Зонды с двойной меткой предназначены для гибридизации с матрицей между двумя праймерами и применяются в сочетании с ферментом ДНК-полимеразой, которая характеризуется присущей ей 5'-3'-эндонуклеазной активностью. В случае, когда зонд является интактным, флуоресценция репортерного красителя гасится из-за близости гасителя. В ходе фазы элонгации каждого цикла ПЦР 5'-эксонуклеазная активность фермента ДНК-полимеразы обеспечивает расщепление отожденного зонда с высвобождением репортерного красителя из зонда, что приводит к увеличению флуоресценции. Это увеличение флуоресценции прямо пропорционально количеству амплифицированной ДНК-мишени, присутствующей в реакции. Флуоресценция постоянно отслеживается на протяжении всей ПЦР-реакции. В ходе ранних циклов ПЦР-реакции величина флуоресценции находится ниже порога обнаружения прибора. Отслеживание сигнала флуоресценции продолжается, отмечается первый цикл ПЦР, в котором обнаруживается флуоресценция. Чем больше ДНК-мишени присутствует в образце в начале реакции, тем раньше обнаруживается флуоресценция, что обратно коррелирует с количеством ДНК-мишени в образце.

В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, обеспечивает амплификацию фрагмента размером 144 п. о. В одном варианте

осуществления комбинация праймеров и зондов, имеющая последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, обеспечивает амплификацию фрагмента размером 144 п. о.

Реакционная смесь также содержит комбинацию праймеров и зондов, селективную в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов выбрана из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, где SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, где SEQ ID NO: 22 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; ж) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, где SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; и ф) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, где SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце.

В одном варианте осуществления реакционная смесь необязательно содержит комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля. В одном варианте осуществления смесь содержит комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце.

В одном варианте осуществления способ дополнительно предусматривает

комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель, выбранный из 6-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM) или 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеина (VIC), на 5'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце.

В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце. В одном варианте осуществления гаситель выбран из нефлуоресцентного гасителя, связывающегося с малой бороздкой (MGB-NFQ), и гасителя флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 имеют нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28 имеют гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте

осуществления SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 22 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов нацеливается на неструктурный (NS) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов нацеливаются на неструктурный (NS) белок и структурный капсидный (VP) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов нацеливаются на структурный капсидный белок (VP) BPV-3.

В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов нацеливаются на структурный капсидный белок (VP) BPV-3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 3535-3554 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 3667-3643 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 3571-3588 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 2, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов содержится прямой праймер, который нацеливается на положения 1734-1716 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 1618-1645 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 1665-1678 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов содержится прямой праймер, который

нацеливается на положения 2862-2878 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 2963-2938 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 2902-2930 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 21, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 22. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов содержится прямой праймер, который нацеливается на положения 3051-3068 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 3134-3114 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 3079-3102 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 24, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 25, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов содержится прямой праймер, который нацеливается на положения 3061-3079 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 3140-3122 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 3081-3103 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления в комбинации праймеров и зондов прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 27, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления комбинации праймеров и зондов нацеливаются на структурный капсидный (VP) белок и неструктурный (NS) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 2190-2209 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 2256-2236 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 2213-2226 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 5, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов нацеливается на

неструктурный (NS) белок BPV-3. В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 1331-1352 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 1474-1453 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 1377-1391 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит прямой праймер, который нацеливается на положения 1453-1474 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, обратный праймер, который нацеливается на положения 1562-1539 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967, и зонд, который нацеливается на положения 1507-1522 для олигонуклеотида в изоляте BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967. В одном варианте осуществления прямой праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, обратный праймер имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11, а зонд имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления комбинация праймеров и зондов содержит SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, содержащей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце, а SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

Реакционные смеси, используемые в описанных в данном документе способах, могут дополнительно содержать один или несколько контролей. Эти контроли включают один или несколько из контроля без матрицы, который содержит все реагенты для ПЦР, кроме ДНК-матрицы; отрицательного контроля экстракции для отслеживания перекрестного загрязнения в ходе экстракции нуклеиновых кислот и проверки того, что анализ не дает ложноположительных результатов с неспецифической фоновой ДНК; положительного контроля экстракции для оценки эффективности экстракции ДНК в ходе получения тестируемого образца и проверки того, что анализ не дает ложноотрицательных результатов; положительного контроля для проверки того, что компоненты qPCR работают точно и дают сигнал ПЦР-амплификации, специфичный для последовательности-мишени; контроля ингибирования для определения уровня интерференции/ингибирования образца, стандарта для определения эффективности ПЦР, линейного диапазона и количественного определения абсолютного числа копий

последовательности-мишени в экстрагированной ДНК тестируемого образца/контроля, и/или внутреннего положительного контроля для отслеживания перекрестного загрязнения плазмидой положительного контроля в тестируемом образце, которая используется в ходе получения образца и проведения анализа.

Подходящий уровень прецизионности, точности и линейности анализа предпочтительно демонстрируется в пределах динамического диапазона аналитических анализов, описанных в данном документе, в частности для количественных анализов. В основе прецизионности анализа лежит сходимость (внутрианалитическая прецизионность) и промежуточная прецизионность (внутрилабораторная прецизионность). Сходимость представляет собой коэффициент вариации (CV) результатов, полученных одним и тем же способом одним и тем же специалистом в одной и той же лаборатории с помощью одного и того же оборудования на одних и тех же образцах в течение короткого периода времени. Для определения сходимости анализа среднее значение и стандартное отклонение (StdDev) количества (геномных копий последовательности-мишени на реакцию, GC/гxn) и % CV количества рассчитывают из каждого набора ПЦР-реакций при соответствующей концентрации. Промежуточная прецизионность учитывает внутренне присущую вариабельность, как, например, обусловленную разными аналитиками, разными системами обнаружения, разным временем. Для определения промежуточной прецизионности анализа среднее значение и StdDev количества и % CV количества рассчитывают из всех наборов ПЦР-реакций при всех соответствующих концентрациях в независимых экспериментах в течение определенного времени.

Точность (также называемая истинностью) предполагает сравнение полученного значения из серии образцов (как, например, плазмиды положительного контроля с определенными концентрациями) с фактическим или эталонным значением, называемым стандартом (ST). Для определения точности анализа среднее значение количества (геномных копий последовательности-мишени на реакцию, GC/гxn) рассчитывают из каждого набора ПЦР-реакций при соответствующей концентрации.

Предел количественного определения (LOQ) количественного анализа методом qPCR представляет собой наименьшее количество последовательности-мишени в образце, которое может быть определено количественно с подходящей прецизионностью (сходимостью и промежуточной прецизионностью) и точностью. Для определения LOQ тестируют наиболее низкий, наиболее высокий и некоторое количество средних диапазонов. Подготавливают плазмиду положительного контроля в наиболее низком, среднем и верхнем диапазоне концентраций, добавляют ее к экзогенной экстрагированной ДНК и проводят количественное определение в соответствующем количестве повторностей в присутствии стандартной кривой, предпочтительно с привлечением разных аналитиков, выполняющих анализ в разные дни.

Предел обнаружения (LOD) или чувствительность анализа представляет собой наименьшее количество последовательности-мишени, которое может быть обнаружено с помощью анализа, но не обязательно количественно выражено в виде точного значения.

Робастность анализа может быть определена в соответствии со способом Юдена-Штайнера (Youden, Steiner, *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*, Association of Official Analytical Chemists ed., Arlington 1975, pps. 33-36, 70-71, 82083). Например, можно оценивать изменения концентраций определенных критически важных реагентов. Определенные критически важные параметры ПЦР могут быть выбраны и подвергнуты незначительным изменениям. Критерий приемлемости требует, чтобы ответ, полученный для любого условия робастности в отношении применяемых небольших изменений, соответствовал установленным критериям приемлемости анализа.

В настоящем изобретении представлен анализ для количественного определения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца. В одном варианте осуществления представлен анализ для количественного определения от $1E3$ до $1E8$ геномных копий геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в ПЦР-реакции.

В настоящем изобретении представлен способ количественного определения от $1E3$ до $1E8$ геномных копий геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в ПЦР-реакции, предусматривающий 1) реакцию смесь, содержащую экстрагированную ДНК тестируемого образца, положительный контроль, плазмидную ДНК положительного контроля BPV-3_IPC, реагенты для амплификации нуклеиновых кислот, комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце, и комбинацию праймеров и зондов, селективную в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, выбранную из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; в) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, где SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; ф) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID

NO: 21, где SEQ ID NO: 21 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, где SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; и h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, где SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; 2) осуществление в отношении реакционной смеси методики количественной ПЦР с получением копий последовательности-мишени и 3) измерение любого увеличения сигнала флуоресценции.

В одном варианте осуществления динамический диапазон составляет от $1E3$ до $1E8$ GC/гxn. В одном варианте осуществления нижний предел количественного определения составляет $1E3$ GC/гxn. В одном варианте осуществления верхний предел количественного определения составляет $1E8$ GC/гxn. В одном варианте осуществления предел обнаружения (LOD95%) количественного анализа составляет 27 геномных копий на реакцию с 95% доверительным интервалом от 22 до 34 геномных копий на реакцию. В одном варианте осуществления анализ характеризуется линейностью с коэффициентом корреляции (R^2) $\geq 0,98$ и эффективностью ПЦР-амплификации в пределах 90-110%. В одном варианте осуществления анализ характеризуется величиной сходимости, которая представляет собой % CV количества, который равняется или меньше 25%. В одном варианте осуществления анализ характеризуется величиной промежуточной прецизионности, которая представляет собой % CV количества, который равняется или меньше 30%. В одном варианте осуществления анализ характеризуется величиной точности в пределах $\pm 30\%$ от принятого эталонного значения (ST) во всем динамическом диапазоне анализа. В одном варианте осуществления анализ характеризуется пределом количественного определения, который представляет собой % CV количества для сходимости при $\leq 25\%$, промежуточной прецизионности при $\leq 30\%$ и критерия приемлемости для точности (величины для наиболее низкого, среднего и верхнего значения диапазона) в пределах $\pm 30\%$ от ожидаемого стандартного (ST) эталонного значения. В одном варианте осуществления анализ характеризуется робастностью с процентным CV количества для сходимости $\leq 25\%$, промежуточной прецизионности $\leq 30\%$ и точности среднего значения количества для тестируемого условия с комбинированной матрицей $\pm 30\%$ от среднего значения количества для оптимизированного условия.

В настоящем изобретении представлен набор для применения в обнаружении загрязнения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащий комбинацию праймеров и зондов, которая обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей BPV-3, выбранную из группы, состоящей из а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; б) комбинации

праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; с) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15; f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22; g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28; и необязательно комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

Хотя терминология, используемая в настоящей заявке, является стандартной в данной области техники, в данном документе представлены определения некоторых терминов для обеспечения ясности и определенности смысла формулы изобретения. Единицы измерения, приставки и символы могут быть обозначены в их форме, принятой в Международной системе единиц (SI). Упоминаемые в данном документе числовые диапазоны включают числа, определяющие границы диапазона, и включают и поддерживают каждое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в данном документе, обычно выполняют в соответствии с традиционными способами, хорошо известными из уровня техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всего настоящего описания, если не указано иное. Все документы или части документов, цитируемые в настоящей заявке, включая без ограничения патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, настоящим явно включены посредством ссылки.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе, которые подразумеваются в качестве отдельных иллюстраций индивидуальных аспектов настоящего изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Безусловно, специалистам в данной области из предшествующего описания и сопровождающих графических материалов станут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе. Предполагается, что такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Описываемое в аспекте или варианте осуществления настоящего изобретения можно объединять с другими аспектами и/или вариантами осуществления настоящего изобретения.

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые

результаты, представлены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Разработка набора праймеров/зондов для BPV-3

Для определения локализации консервативных областей генома BPV-3 все опубликованные полногеномные последовательности изолятов BPV-3 были взяты из GenBank (таблица 1).

Таблица 1. Номера доступа в GenBank

Род	Вид	Изолят	№ доступа в GenBank
Erythroparvovirus	Ungulate erythroparvovirus 1	Парвовирус крупного рогатого скота 3 типа	AF406967
			MG745680
			NC_037053
			MG026727
			MG026728

Проводили множественные выравнивания, и отбирали различные консервативные области в генах, кодирующих неструктурный (NS) белок и структурный капсидный (VP) белок BPV-3, которые применялись для разработки восьми различных наборов праймеров/зондов (BPV-3 v1.0 - BPV-3 v8.0). Зонды помечали флуоресцентным репортерным красителем 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентным гасителем, связывающимся с малой бороздкой (MGB-NFQ), либо гасителем флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце (Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния или Integrated DNA Technologies, Inc., Коралвилл, Айова). В таблице 2 приведены положения для олигонуклеотидов и последовательности зондов и праймеров из наборов. Наборы праймеров/зондов синтезировали и тестировали с использованием диапазона пяти логарифмов концентраций плазмиды положительного контроля (от $1e7$ до $1e3$) в 6 повторностях.

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов, используемых для BPV-3 v3.0. Положения для олигонуклеотидов для зонда/праймеров приведены согласно изоляту BPV-3 с номером доступа в GenBank AF406967

Зонд/ праймер Мишень	Положение для олигонуклеотида	Функция олигонуклеотида	Последовательность (5' → 3')
BPV-3 v1.0 Ген: VP	3535-3554	Прямой праймер	CATCGGCTATAAAACCCCAT SEQ ID NO: 1
	3667-3643	Обратный праймер	GGACAGTATTATTCCATGCTC TCT SEQ ID NO: 2

	3571-3588	Зонд	CAACGCCATCAATCGCCA SEQ ID NO: 3 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: ZEN и IBFQ
BPV-3 v2.0 Ген: NS-VP	2190-2209	Прямой праймер	GGGTTAGAAACGCTGCAATC SEQ ID NO: 4
	2256-2236	Обратный праймер	AGCAAGCGAGAGGACATAGTC SEQ ID NO: 5
	2213-2226	Зонд	TTAGGTATGGCGTT SEQ ID NO: 6 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: MGB-NFQ
BPV-3 v3.0 Ген: NS	1331-1352	Прямой праймер	GCATAAATGTGTCTTGGTGTGG SEQ ID NO: 7
	1474-1453	Обратный праймер	ATTAATACGGGAGTGGGAGAC A SEQ ID NO: 8
	1377-1391	Зонд	ATTGTTGAGGCTGTA SEQ ID NO: 9 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: MGB-NFQ
BPV-3 v4.0 Ген: NS	1453-1474	Прямой праймер	TGTCTCCCACTCCCGTATTAAT SEQ ID NO: 10
	1562-1539	Обратный праймер	AATGACCATCCTCTCACTTAAA GC SEQ ID NO: 11
	1507-1522	Зонд	ATGGAAACATTGTTAC SEQ ID NO: 12 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: MGB-NFQ

BPV-3 v5.0 Ген: VP	1618-1645	Прямой праймер	TTGTTGATTGGCTAAACTATGT AAAGTC SEQ ID NO: 13
	1734-1716	Обратный праймер	GGGCTTTCCGCTTTATCTC SEQ ID NO: 14
	1665-1678	Зонд	GCTGATACCGTTCA SEQ ID NO: 15 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: MGB-NFQ
BPV-3 v6.0 Ген: VP	2862-2878	Прямой праймер	ATGCCTCCGAGCAACAC SEQ ID NO: 20
	2963-2938	Обратный праймер	CCTCTCTAGACTCTTCTCTAGA TTCA SEQ ID NO: 21
	2902-2930	Зонд	CCCAGATATCACATCTTCTGTC GGAAACA SEQ ID NO: 22 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: ZEN и IBFQ
BPV-3 v7.0 Ген: VP	3051-3068	Прямой праймер	CGGTGGCCACAGCATATC SEQ ID NO: 23
	3134-3114	Обратный праймер	GGGACCCACTAGGATACATTTG SEQ ID NO: 24
	3079-3102	Зонд	TCAGTTCTTGCGGGACTACTTG GC SEQ ID NO: 25 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: ZEN и IBFQ
BPV-3 v8.0 Ген: VP	3061-3079	Прямой праймер	AGCATATCCTCGGCCTGAT SEQ ID NO: 26
	3140-3122	Обратный праймер	GATACCGGGACCCACTAGG SEQ ID NO: 27
	3081-3103	Зонд	AGTTCTTGCGGGACTACTTGGC

			С SEQ ID NO: 28 Репортерный краситель: FAM Краситель-гаситель: ZEN и IBFQ
--	--	--	--

Исходя из LOD, динамического диапазона, эффективности ПЦР и значения R^2 , BPV-3 v3.0 отбирали для применения в разработке и квалификации анализа. Праймеры обеспечивали амплификацию фрагмента BPV 3 размером 144 п. о. Зонд имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце (Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния). Разработанные последовательности праймеров/зондов BPV-3 v3.0 полностью совпадали с последовательностями всех пяти последовательностей подсемейства Parvovirinae по результатам анализа *in silico*. Множественные выравнивания с другими парвовирусами не давали совпадений, что указывало на то, что последовательности комбинации праймеров и зондов были специфичными в отношении BPV-3.

Набор праймеров/зондов внутреннего положительного контроля и плазмидная ДНК положительного контроля BPV-3_IPC

Внутренний положительный контроль (IPC) был разработан для отслеживания эффективности экстракции и любого случайного перекрестного загрязнения между добавленными плазмидами положительного контроля и экстрагированной ДНК тестируемого образца. Зонд IPC (IPC v2.0) метили флуоресцентным репортерным красителем 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксифлуоресцеином (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентным гасителем, связывающимся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце (Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния). Набор праймеров/зондов IPC обеспечивал амплификацию фрагмента размером 67 п. о., что позволило отличить его от праймера/зонда для BPV-3. В таблице 3 приведены функция олигонуклеотида и последовательности зондов и праймера. Этот набор зондов/праймеров применялся для дальнейшей разработки и квалификации анализа BPV-3.

Таблица 3. Последовательности праймеров и зондов, используемых для IPC, v2.0

Зонд/праймер Мишень	Функция олигонуклеотида	Последовательность (5' → 3')
IPC v2.0	Прямой праймер	AACTTGGTCAGAGATCGAGGAGG SEQ ID NO: 16
	Обратный праймер	CCGCCAGTGTGCTGGAAT SEQ ID NO: 17
	Зонд	CGCCCTTCGAAGCAC SEQ ID NO: 18 Репортерный краситель: VIC-MGB Краситель-гаситель: MGB-FNQ

Для создания плазмидной ДНК положительного контроля BPV-3_IPC

последовательности-мишени BPV-3 и IPC синтезировали и клонировали в вектор pUC57. 5'-концы последовательностей положительного контроля несли геном-мишень BPV-3, а 3'-концы последовательностей положительного контроля несли последовательность-мишень IPC. Таким образом, плаزمида положительного контроля несет как BPV-3, так и последовательность IPC, которая служила в качестве положительного контроля BPV-3, а также внутреннего положительного контроля для отслеживания эффективности экстракции и любого случайного перекрестного загрязнения. Последовательность ДНК положительного контроля показана в таблице 4.

Таблица 4. Плазмидная ДНК положительного контроля BPV-3_IPC

<p>5'AATGAAAATTTCCCTTCAATGATGCGCCGCATAAATGTGTCTTGGTGTGGGACG AAGGCCGAATTACGGCCAAAATTGTTGAGGCTGTAAAGAGCATTCTGGGGGGTCA GGCGGTGCGGGTGGATCAGAAATGCAAGGGCTCTGTAAGCTTGTCTCCCACTCCC GTATTAATCACATCTAATGCTGATATTCGATATGTGCGTGATGGAAACATTGTTAC TGGGGATCATGTAAGCTTTAAGTGAGAGGATGGTCATTGTACATTTCTCTACTC CGTGCCCCGCCAATTTTGGGCTTTTGAAAGCGGAGGAAATTGTTGATTGGCTAAAC TATGTAAGTCATGCCCCGGGGAGTATCACTGCTGATACCGTTCAGGCCACGTGGG GAACACGCTCCGCCCCCAATTTATTTGAGATAAAGCGGAAAGCCCCACAGCCCGC CAGTCCCATTGAACCTCAGACGGAGGAACAAGAAGAAGCAGCCGCATATCGCTGT CAGAGCCCAACTTGGTCAGAGATCGAGGAGGATTTGAGAGCGTGCTTCGAAGGGC GAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTGCGCGCACATTCACCAAG 3' SEQ ID NO: 19</p>

Пример 2. Качественный анализ BPV-3

Получение образцов

В случае с тестируемыми образцами, содержащими клетки, перед экстракцией ДНК образцы подвергали низкоскоростному центрифугированию (LSC) от 320 x g до 1000 x g в течение 10 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость собирали для экстракции ДНК. Образцы, не содержащие клеток, подвергали незамедлительной обработке.

К 250 мкл тестируемого образца добавляли 10 мкл смеси ферментов RNase Cocktail™ (Thermo Fisher, Карлсбад, Калифорния) и 0,5 М EDTA, pH 8,0 в виде смеси (9 мкл:1 мкл). Для экстракции ДНК из тестируемого образца применяли систему для экстракции нуклеиновых кислот AutoMate Express™ (ThermoFisher). На AutoMate для процедуры экстракции ДНК выбирали протокол PrepSEQ (PS) Express 1-2-3 со следующими параметрами: 1-часовое расщепление протеиназой К (ПК) и элюирование 100 мкл.

Экстрагированную ДНК визуально осматривали, и если в элюированной ДНК оставались какие-либо магнитные гранулы, использовали настольную рабочую станцию DynaMag™-2 Magnet (ThermoFisher) для удаления каких-либо оставшихся гранул в

элюированной ДНК. ДНК использовали сразу или хранили при -30С.

Наряду с ДНК, экстрагированной из тестируемых образцов, контрольная плаزمида BPV-3_IPC (PEC) и отрицательный контроль экстракции (NEC) были также получены и прогнаны, как описано выше. Для положительного контроля экстракции к 250 мкл стерильного 1X фосфатно-солевого буфера (PBS) добавляли 62000 геномных копий (GC) плазмидной ДНК BPV-3_IPC. Положительный контроль экстракции использовали для оценивания эффективности экстракции ДНК в ходе получения образцов. При предположении о 100% эффективности экстракции ДНК конечная элюированная ДНК должна содержать 500 GC/мкл. Отрицательный контроль экстракции содержал 250 мкл стерильного 1x PBS. Отрицательный контроль экстракции использовали для отслеживания любого случайного перекрестного загрязнения, которое может произойти в ходе экстракции нуклеиновых кислот.

Получение дополнительных аналитических контролей обнаружения BPV-3

Контроль без матрицы (NTC): контроль без матрицы содержал все реагенты для ПЦР, кроме ДНК-матрицы. Он использовался в качестве отрицательного контроля для проверки отсутствия загрязнения ДНК в исходных материалах для qPCR.

Положительный контроль (PC): положительный контроль содержал 2000 GC/реакция рекомбинантной плазмидной ДНК BPV-3_IPC. Положительный контроль использовали для проверки точности анализа.

Контроль ингибирования (INH): контроль ингибирования используется для отслеживания ПЦР-амплификации и уровня интерференции или ингибирования, обусловленного матрицей тестируемого образца. К конечной экстрагированной ДНК из тестируемого образца добавляли (+S) такое же количество плазмиды BPV-3_IPC (2000 GC/реакция) в качестве положительного контроля. СТ (пороговое число циклов) представляет собой число циклов, необходимое для того, чтобы флуоресцентный сигнал пересек пороговое значение (т. е. превысил фоновый уровень). Среднее значение порогового числа циклов (СТ) для контроля ингибирования (+S) сравнивали со средним значением СТ для положительного контроля в качестве меры интерференции или ингибирования. Значение ΔST должно быть меньше 3,32 СТ (что равно одному логарифму концентрации ДНК). Ингибирование или интерференцию рассчитывали как $\Delta ST = PC$ (среднее СТ) - INH (среднее СТ).

Средства для организации анализа для обнаружения BPV-3 методом qPCR и IPC методом qPCR

Получали два разных мастер-микса: мастер-микс для qPCR BPV-3 для анализа BPV_3 методом qPCR и мастер-микс для qPCR IPC для анализа IPC методом qPCR.

Средства для организации анализа обнаружения BPV-3 методом qPCR содержали набор праймеров/зондов BPV-3 v3.0 для обнаружения ДНК BPV-3 в ДНК, экстрагированной из тестируемого образца. Мастер-микс для qPCR BPV-3 содержал набор праймеров/зондов BPV-3 v3.0, воду и универсальный мастер-микс для ПЦР 2X TAQMAN[®] (Applied Biosystems). Универсальный мастер-микс для ПЦР 2X TAQMAN[®]

содержал необходимые компоненты для qPCR-реакции, в том числе оптимизированные буферы для амплификации G/C-богатой последовательности, dNTP с dUTP, ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold™, краситель ROX (в качестве пассивного внутреннего эталона) и UNG AmpErase™ (фермент урацил-ДНК-гликозилазу для устранения загрязнения при переносе продуктами ПЦР, содержащими dU).

В таблице 5 приведено количество каждого компонента реакции для каждого образца, тестируемого в qPCR-реакции BPV-3: ДНК, экстрагированной из тестируемого образца, и пяти контролей - отрицательного контроля экстракции (NEC), контроля без матрицы (NTC), положительного контроля экстракции (PEC), контроля ингибирования (IHN) и положительного контроля (PC) в двух различных концентрациях в количестве выше предела обнаружения (ADL) и количестве на уровне предела обнаружения (DL).

Таблица 5. При наличии положительных контролей ингибирования, тестируемых на уровне предела обнаружения и выше него

	Вода (мкл)	2X TAQMAN® - универсальный мастер-микс для ПЦР (мкл)	Набор праймеров/ зондов BPV-3 v3.0, 60x (мкл)	Экстраги- рованная ДНК (мкл) из тестируе- мого образца	Плазмида PC BPV_IPC (GC/мкл)	
					125	12,5
Тестируемый образец	4,5	15	0,5	10	n/a	n/a
Контроли						
NEC	4,5	15	0,5	10	n/a	n/a
NTC	14,5	15	0,5	n/a	n/a	n/a
PEC	4,5	15	0,5	10	n/a	n/a
IHN_ADL (250 GC/RXN)	2,5	15	0,5	10	2	n/a
IHN_DL (25 GC/RXN)	2,5	15	0,5	10	n/a	2
PC_ADL (250 GC/RXN)	12,5	15	0,5	n/a	2	n/a
PC_DL (25 GC/RXN)	12,5	15	0,5	n/a	n/a	2

Для qPCR-реакции IPC получали мастер-микс с праймерами/зондами IPC, содержащий набор праймеров/зондов IPC, воду и универсальный мастер-микс для ПЦР 2X TAQMAN[®] (Applied Biosystems). Количество каждого компонента реакции для тестируемого образца, а также для четырех контролей - отрицательного контроля экстракции, контроля без матрицы, положительного контроля экстракции и положительного контроля в двух различных концентрациях в количестве выше предела обнаружения (ADL) и количестве на уровне предела обнаружения (DL) - приведено в таблице 6.

Таблица 6. Компоненты qPCR-реакции IPC (качественный анализ)

	Вода (мкл)	2X TAQMAN [®] - универсальный мастер-микс для ПЦР (мкл)	Набор праймеров/ зондов IPC v2.0, 60x (мкл)	Экстраги- рованная ДНК (мкл) из тестируе- мого образца	Плазмида PC BPV_IPC (GC/мкл)	
					125	12,5
Тестируемый образец	4,5	15	0,5	10	n/a	n/a
Контроли						
NEC	4,5	15	0,5	10	n/a	n/a
NTC	14,5	15	0,5	n/a	n/a	n/a
PEC	4,5	15	0,5	10	n/a	n/a
PC_ADL (250 GC/RXN)	12,5	15	0,5	n/a	2	n/a
PC_DL (25 GC/RXN)	12,5	15	0,5	n/a	n/a	2

Как qPCR-реакцию BPV_3, так и qPCR-реакцию IPC проводили в по меньшей мере трех повторностях (3 лунки для ПЦР-реакции) для каждого образца и контроля в 96-луночном реакционном планшете. Организацию действий с компонентами реакции можно проводить вручную либо с помощью робота для манипуляции с жидкостями, такого как устройство для манипуляции с жидкостями QIAgility NEPA/UV (QIAGEN, Inc., Джермантаун, Мэриленд). Для размещения реакционных смесей для qPCR использовали 96-луночный планшет MicroAmp Optical (Applied Biosystems), покрытый оптической адгезивной пленкой MicroAmp (Applied Biosystems). Количество реагирующих компонентов ПЦР, образцов и контролей в каждой ПЦР-реакции приведено в таблицах 6 и 7. Затем запечатанный планшет загружали в систему для проведения ПЦР в режиме

реального времени QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems).

Для проведения qPCR-реакций использовали систему для проведения ПЦР в режиме реального времени QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems). В программе термоциклирования устанавливали следующие значения времени и температуры реакции: 50°C - 2 мин., 95°C - 10 мин. и 40 циклов по 95°C - 15 с, 60°C - 1 мин. (сбор данных). В таблице 7 приведены выбранные экспериментальные свойства.

Таблица 7. Экспериментальные свойства в программном обеспечении QuantStudio™ для qPCR BPV-3 и qPCR IPC

<i>Название экспериментального свойства</i>	<i>Выбранное экспериментальное свойство</i>
<i>Прибор</i>	<i>Система QuantStudio™ 7 Flex</i>
<i>Форма</i>	<i>96-луночный (0,2 мл)</i>
<i>Эксперимент</i>	<i>Стандартная кривая</i>
<i>Реагент</i>	<i>Реагенты TAQMAN®</i>
<i>Свойства прогона</i>	<i>Стандартные</i>
<i>Репортер</i>	<i>- FAM (для набора праймеров/зондов BPV-3 v3.0) - VIC (для набора праймеров/зондов IPC v2.0)</i>
<i>Гаситель</i>	<i>MGB-NFQ</i>
<i>Пассивный краситель</i>	<i>ROX</i>
<i>Пороговое значение</i>	<i>- ΔRn 0,1 для анализа BPV-3 - ΔRn 0,2 для анализа IPC</i>
<i>Исходный уровень</i>	<i>Устанавливается автоматически</i>
<i>Реакционный объем</i>	<i>30 мкл</i>

Критерии валидного теста и оценивание тестируемого образца

До проведения оценивания тестируемых образцов анализ должен соответствовать критериям пригодности системы и приемлемости анализа, чтобы считаться валидным анализом. Если критерии приемлемости анализа не удовлетворены, анализ необходимо повторить. Если тестируемый образец был признан валидным и положительным, анализ следует повторить для подтверждения достигнутого положительного результата. Критерии валидного анализа и оценивание результатов теста для качественного анализа BPV-3 изложены в таблице 8. Если тестируемый образец дает положительный сигнал амплификации, то контроли ИНН и Δ СТ являются нерелевантными и не должны рассматриваться как часть критериев пригодности системы и приемлемости анализа.

Таблица 8. Критерии пригодности системы и приемлемости анализа

Целевые результаты по BPV-3 и IPC для NTC и NEC	По меньшей мере 2 из 3 реакций NTC и NEC должны показать отсутствие сигнала амплификации (СТ=40,00).
---	--

Целевые результаты по ВРV-3 для РС, РЕС и ИНН	РС, РЕС и ИНН должны давать сигнал амплификации в по меньшей мере 2 из 3 реакций (СТ менее 40,00).
Целевые результаты по ИРС для РС и РЕС	РС и РЕС должны давать амплификацию в по меньшей мере 2 из 3 реакций (СТ менее 40,00).
Целевой результат по ВРV-3 для ΔСТ	Расчет интерференции/ингибирования по уравнению $\Delta\text{СТ} = \text{РС (среднее СТ)} - \text{ИНН (среднее СТ)} $. Если ΔСТ равняется или превышает 3,32, анализ считается невалидным.

Критерии приемлемости результатов для тестируемых образцов

Если анализ соответствует критериям пригодности системы и приемлемости анализа, в таблице 9 приведены критерии приемлемости тестируемого образца. Результаты качественного анализа представляются как "положительные" или "отрицательные".

Таблица 9. Критерии приемлемости тестируемого образца.

Критерии положительности тестируемого образца	Тестируемый образец представляется как "положительный", если по меньшей мере 2 из 3 реакций дают положительный сигнал амплификации (СТ менее 40,00) для целевого ВРV-3; и по меньшей мере 2 из 3 повторностей не дают сигнала амплификации (СТ=40,00) для целевого ИРС.
Критерии отрицательности тестируемого образца	Тестируемый образец представляется как "отрицательный", если по меньшей мере 2 из 3 повторностей не показывают сигнал амплификации (СТ=40,00) для обоих из целевых ВРV-3 и ИРС.

Стратегия повторного тестирования

Анализ может быть повторен с использованием разведения 1:2 экстрагированной ДНК, если ΔСТ не соответствует критериям приемлемости при использовании чистого образца ДНК. Разбавление уменьшит интерференцию матрицы образца. В этом случае перед повторным анализом все образцы и контрольную ДНК необходимо разбавить водой, чистой для молекулярно-биологического анализа, в соотношении 1:2.

Если тестируемый образец показывает положительный сигнал амплификации для целевого ИРС, это указывает на перекрестное загрязнение тестируемого образца плазмидной ДНК положительного контроля. В этом случае анализ считается невалидным, и после осуществления очистки от загрязнения в соответствии с процедурой, применяемой в исследовательском центре, анализ необходимо повторить.

Пример 3. Тестирование качественного анализа ВРV3

Специфичность: эффект матрицы образца (для тестирования на отсутствие ложноположительных результатов)

Три матрицы образцов (среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) (ThermoFisher) и две фетальные бычьи сыворотки (FBS) (SAFC, Сент-Луис, Миссури, и NuClone, Логан, Юта)) тестировали для демонстрации отсутствия ложноположительных результатов между компонентами среды и наборами праймеров/зондов BPV-3 v3.0 и IPC v2.0. Процедуры и средства для организации анализа были такими же, как описано в примере 2.

В таблице 10 показаны тестируемые образцы и результаты тестирования методом qPCR для анализов BPV-3 и IPC. Критерий приемлемости данной процедуры требовал, чтобы все тестируемые образцы показывали отрицательный результат при использовании обоих наборов праймеров/зондов. Результаты валидных экспериментов, в которых все осуществленные контроли и пригодность системы соответствовали критериям приемлемости, выявили, что все тестируемые образцы были отрицательными и не показали сигнала амплификации (СТ=40,00).

Таблица 10. Результаты из матриц образцов

Матрица образца	ПЦР, повторно сти	BPV-3 v3.0, среднее значение ± SD CT	IPC v2.0, среднее значение ± SD CT	Результаты
DMEM	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
DMEM	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
FBS	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
FBS	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
NTC	3	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
PC	3	29,21 ± 0,26	28,67 ± 0,04	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
PEC	3	28,57 ± 0,13	28,10 ± 0,21	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует

Обнаружение BPV-3 (для тестирования отсутствия ложноотрицательных результатов)

Ввиду отсутствия коммерчески доступных исходных культур вируса BPV-3 или

геномной ДНК BPV-3 для тестирования специфичности набора праймеров/зондов BPV-3 v3.0 использовали плазмиду положительного контроля BPV-3_IPC. Плазида BPV-3_IPC была секвенирована, и точность определения гена NS BPV-3 была подтверждена BLAST-анализом.

Применяли анализ, описанный в примере 2. В рамках тестирования на специфичность два образца фетальной бычьей сыворотки и необработанный не соответствующий GMP образец собранного материала, содержащий FBS, которые были подтверждены как положительные в отношении ДНК BPV-3 (с использованием панели для qPCR Bovine Parvo от BioReliance (BREL), BioReliance, Роквилл, Мэриленд), служили в качестве истинно положительных образцов. Положительный контроль (PC) был подтвержден секвенированием.

Критерии приемлемости данной процедуры требовали, чтобы все тестируемые образцы показали положительный результат при применении анализа BPV-3, и чтобы анализ не дал ложноотрицательного результата на ранее подтвержденном положительном образце BPV-3.

В таблице 11 показаны результаты обнаружения BPV-3 в PC, все из которых удовлетворяли критерию приемлемости. Следует отметить, что праймеры и зонды IPC v2.0 давали отрицательный результат в положительных образцах FBS и необработанных не соответствующих GMP образцах собранного материала, содержащих FBS, как и ожидалось, и давали положительные результаты только при использовании плазмиды положительного контроля (BPV-3_IPC). Результаты qPCR-реакций IPC соответствовали ожиданиям и удовлетворяли критерию приемлемости.

Таблица 11. Результаты тестирования истинно положительных образцов

Образец	Повторности	BPV-3 v3.0, среднее значение \pm SD CT	IPC v2.0, среднее значение \pm SD CT	Результаты
FBS № 1	4	21,78 \pm 0,21	40,00 \pm 0,00	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
FBS № 2	4	25,35 \pm 0,12	40,00 \pm 0,00	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
Необработанный не соответствующий GMP образец собранного материала, содержащий FBS	6	29,55 \pm 0,29	40,00 \pm 0,00	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует

PC	3	29,21 ± 026	28,67 ± 0,04	ПОЛОЖИТЕЛ ЬНЫЙ/ Соответствует
NTC	3	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует

Перекрестная реактивность

Для тестирования эффекта перекрестной реактивности наборов праймеров/зондов BPV-3 v3.0 и IPC v2.0 экстрагированные нуклеиновые кислоты, полученные из различных вирусов и клеточных линий, оценивали с помощью анализа, описанного в примере 2. Коммерчески доступные парвовирусы, наиболее близкородственные BPV-3 - парвовирус крупного рогатого скота 1 типа (BPV-1) (VR-767™ в ATCC®) и мелкий вирус мышей (MMV, парвовирус грызунов) - были включены для проверки перекрестной реактивности. Несколько других ДНК-содержащих вирусов были включены для тестирования перекрестной реактивности: цирковирус свиней 2 типа (PCV 2), вирус простого герпеса 1 типа (HSV 1), вирус болезни Ауески (Prv). Также тестировали ДНК из четырех клеточных линий: клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO), клеток почки новорожденного хомяка (ВНК), клеток яичника китайского хомячка (СНО), клеток головного мозга кошки, трансформированных MSV (PG 4). ДНК экстрагировали, как описано в примере 2.

Точность экстрагированной нуклеиновой кислоты из всех вирусов была подтверждена с помощью специфического способа qPCR собственной разработки или секвенирования нового поколения (NGS).

Критерий приемлемости данной процедуры требовал, чтобы все тестируемые виды показывали отрицательный результат (СТ=40,00) при использовании наборов праймеров/зондов BPV-3 v3.0 и IPC v2.0. В таблице 12 показано, что результаты тестирования перекрестной реактивности выявили, что все тестируемые виды были отрицательными в отношении BPV-3 и удовлетворяли критерию приемлемости.

Таблица 12. Результаты тестирования перекрестной реактивности

Вид	Ген	Повторности	BPV-3 v3.0, среднее значение ± SD СТ	IPC v2.0, среднее значение ± SD СТ	Результаты
Парвовирус крупного рогатого скота 1 типа	ssDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
<i>Мелкий вирус мышей</i>	ssDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/

					Соответствует
Цирковирус свиней 2 типа	ssDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
Вирус простого герпеса 1 типа	dsDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
<i>Вирус болезни Ауески</i>	dsDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
Почка африканской зеленой мартышки	dsDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
Почка новорожденного хомяка	dsDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
Яичник китайского хомячка	dsDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
Головной мозг кошки, трансформированный MSV	dsDNA	6	40,00 ± 0,00	40,00± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует
NTC	n/a	6	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	ОТРИЦАТЕЛЬ НЫЙ/ Соответствует

Предел обнаружения (LOD)

Способ qPCR BPV-3 предназначен для получения качественного результата, доказательство линейности не требуется. На практике LOD определяется как точка отсечения в виде минимального количества амплифицированных последовательностей-мишеней по соотношению положительных результатов, обнаруживаемого в 95% серии образцов, что обозначается как LOD95%.

Для определения чувствительности или аналитического предела обнаружения (ALOD) способа плазмидную ДНК BPV-3_IPC разбавляли в различных концентрациях (1, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 250, 500 GC/ПЦР-реакция). ALOD представляет собой концентрацию ДНК-мишени, при которой продукт амплификации обнаруживается с

вероятностью в по меньшей мере 0,95 (LOD95%). Чтобы протестировать это, двенадцать повторных измерений ПЦР для каждой концентрации плазмидной ДНК оценивали при отсутствии матрицы образца, используя анализ, описанный в примере 2. Уровень концентрации с наименьшим количеством геномных копий, для которого все 12 повторностей были положительными, считался приблизительным значением LOD95%.

Пробит-анализ использовали с ассоциированной вероятностью 95% для расчета ALOD для анализа BPV-3 методом qPCR. Результаты анализа продемонстрировали, что ALOD для анализа BPV-3 методом qPCR составляет приблизительно 22 геномные копии на реакцию (фигура 1).

Предел обнаружения образца (SLOD) представляет собой минимальное количество последовательности-мишени, которое может быть обнаружено с заданным уровнем достоверности (LOD95%) в присутствии матрицы образца. Эксперименты по определению SLOD проводили таким же образом, как и эксперименты для ALOD, за исключением того, что к экстрагированной ДНК из различных матриц образцов добавляли плазмидную ДНК положительного контроля в различных концентрациях (25, 50, 75 и 100 GC/реакция), а не воду, чистую для молекулярно-биологического анализа (MBGW).

В данном исследовании использовались различные матрицы образцов, см. таблицу 13. К каждому образцу добавляли 25, 50, 75 и 100 геномных копий (плазмиды положительного контроля BPV-3_IPC) на реакцию с помощью устройства для манипуляции с жидкостями QIAgility (QIAGEN, Inc.) и тестировали с помощью анализа обнаружения BPV-3 методом qPCR, описанного в примере 2. Все образцы оценивали в 12 повторностях. В таблицах 14 и 15 представлены результаты в отношении SLOD. Результаты выявили, что SLOD для анализа BPV-3 методом qPCR составляет 25 геномных копий на ПЦР-реакцию. Аналогичные результаты были получены для анализа IPC методом qPCR (таблица 16).

Таблица 13. Образцы матриц, используемые для определения SLOD

Образец	Количество ДНК
FBS	10 мкл ДНК/qPCR-реакция
Vero	30 нг/10 мкл ДНК/qPCR-реакция
ВНК	30 нг/10 мкл ДНК/qPCR-реакция
CHO	50 нг/10 мкл ДНК/qPCR-реакция

Таблица 14. Результаты SLOD для анализа BPV-3 с использованием FBS и клеток Vero

Матрица образца	FBS с добавлением PC				Vero с добавлением PC			
	25	50	75	100	25	50	75	100
Повторности и GC/гxn	25	50	75	100	25	50	75	100
Повторность 1	34,35	34,15	32,41	32,65	34,83	33,82	33,54	31,94
Повторность 2	34,90	34,68	32,77	32,47	34,71	34,45	33,23	32,97

Повторность 3	34,35	33,80	32,52	32,35	34,91	33,70	33,45	33,08
Повторность 4	34,32	34,31	33,04	32,71	34,75	34,01	33,73	33,11
Повторность 5	32,96	33,87	32,67	32,57	35,38	34,22	32,85	33,00
Повторность 6	35,13	33,39	33,20	32,97	34,04	33,86	32,97	33,16
Повторность 7	34,63	34,08	33,24	33,05	35,96	34,32	33,43	32,97
Повторность 8	35,78	34,57	33,21	33,39	34,44	33,71	33,40	33,10
Повторность 9	33,06	34,33	32,80	33,30	36,55	33,43	33,46	33,30
Повторность 10	35,04	33,61	33,39	32,96	34,78	34,12	33,54	32,96
Повторность 11	34,78	33,70	33,41	32,97	34,29	33,69	33,18	32,95
Повторность 12	34,45	34,56	33,38	33,17	36,01	34,01	33,31	33,62
Среднее значение	34,48	34,09	33,00	32,88	35,05	33,95	33,34	33,01
Соотношение положительных сигналов	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Соотношение положительных сигналов, %	100	100	100	100	100	100	100	100

Таблица 15. Результаты SLOD для анализа BPV-3 с использованием клеток ВНК и СНО

Матрица образца	ВНК с добавлением РС				СНО с добавлением РС			
	25	50	75	100	25	50	75	100
Повторности и GC/гхп								
Повторность 1	34,84	34,23	33,05	32,39	34,55	34,07	32,58	33,31
Повторность 2	34,22	33,94	33,20	32,14	34,17	33,46	32,16	32,74
Повторность 3	35,22	33,70	32,97	32,96	34,37	33,61	33,06	32,77
Повторность 4	34,50	33,96	33,26	32,96	33,44	33,60	32,54	31,99
Повторность 5	34,09	34,29	33,12	32,96	34,24	32,51	32,94	33,35
Повторность 6	34,29	33,54	32,99	32,55	33,79	33,43	33,11	33,47
Повторность 7	34,62	34,19	33,43	32,81	34,18	33,36	33,58	33,34
Повторность 8	34,18	33,67	33,31	32,95	34,47	33,50	32,68	33,15
Повторность 9	33,96	34,10	33,11	32,16	33,93	33,53	33,68	32,10
Повторность 10	34,78	33,44	32,78	32,52	34,44	33,51	33,36	32,60
Повторность 11	34,20	33,91	33,12	32,63	34,25	34,09	33,05	32,85

Повторность 12	34,25	33,45	32,87	32,99	35,01	33,51	32,29	32,94
Среднее значение	34,43	33,87	33,10	32,67	34,24	33,51	32,92	32,88
Соотношение положительных сигналов	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
% положительных сигналов	100	100	100	100	100	100	100	100

Таблица 16. Результаты SLOD для анализа IPC с использованием FBS и клеток Vero

Матрица образца	FBS с добавлением PC				Vero с добавлением PC			
	25	50	75	100	25	50	75	100
Повторности и GC/гxn	25	50	75	100	25	50	75	100
Повторность 1	34,22	33,23	32,28	32,32	35,02	33,97	32,13	32,09
Повторность 2	33,69	32,76	31,83	31,86	33,88	34,19	31,95	32,19
Повторность 3	34,08	34,20	32,19	31,48	34,61	33,82	32,17	30,96
Повторность 4	34,54	33,74	32,49	32,15	33,54	33,77	32,39	32,17
Повторность 5	33,75	33,70	32,17	32,21	33,81	33,79	32,01	31,77
Повторность 6	33,88	33,78	32,19	32,37	34,46	33,45	32,08	32,47
Повторность 7	35,36	33,88	32,36	31,94	34,37	33,26	31,98	31,98
Повторность 8	34,34	33,83	32,06	32,34	34,25	34,24	32,08	31,69
Повторность 9	31,13	33,54	32,22	32,26	34,26	33,81	31,80	31,99
Повторность 10	33,79	33,45	30,79	29,74	34,51	33,51	32,45	31,30
Повторность 11	35,83	33,90	31,97	31,98	35,57	33,70	32,35	32,00
Повторность 12	35,17	33,31	32,57	31,38	34,64	33,25	32,11	31,55
Среднее значение	34,15	33,61	32,09	31,84	34,41	33,73	32,12	31,85
Соотношение положительных сигналов	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
% положительных сигналов	100	100	100	100	100	100	100	100

Робастность

Для оценивания робастности анализа обнаружения BPV-3 методом qPCR тестировали необработанные не соответствующие GMP образцы собранного материала, содержащие FBS, и образцы FBS (таблица 17). Критерием приемлемости является удовлетворение предложенных критериев пригодности системы и приемлемости анализа,

а также критериев приемлемости образца, как описано в примере 2. Образцы были предварительно подтверждены как отрицательные или положительные в отношении ДНК BPV-3 альтернативными способами, такими как NGS, секвенирование ДНК по методу Сэнгера или анализ с использованием панели для qPCR Bovine Parvo от BioReliance (BREL).

Образцы подвергали экстракции ДНК, как описано в примере 2. Все контроли получали и подвергали проведению qPCR параллельно с тестируемым образцом, а затем подвергали анализу обнаружения BPV-3 методом qPCR, как описано в примере 2. Результаты анализа BPV-3 методом qPCR были интерпретированы, как описано в примере 2, и представлены как "положительные" или "отрицательные".

Таблица 17. Тестируемые образцы, используемые для оценивания робастности анализа BPV-3

Образец	Статус BPV-3
FBS	Отрицательный
Облученная FBS № 1	Отрицательный
Охарактеризованная FBS	Отрицательный
Необработанный не соответствующий GMP образец собранного материала, содержащий FBS, № 1	Положительный
Необработанный не соответствующий GMP образец собранного материала, содержащий FBS, № 2	Положительный
Облученная FBS № 2	Положительный
Облученная FBS № 3	Положительный

Результаты для отрицательных тестируемых образцов из таблицы 17 показаны в таблицах 18-20. Валидность анализа была продемонстрирована по результатам для аналитических контролей, включая отрицательные результаты в NTC и NEC для анализов BPV-3 и IPC в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции; обнаружение целевого сигнала амплификации в PC в анализах BPV-3 и IPC в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции; обнаружение сигнала амплификации в анализах BPV-3 и IPC для PEC в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции, что указывает на точную эффективность экстракции; обнаружение BPV-3 в тестируемом образце с добавкой (+S) в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции и результаты ΔСТ, указывающие на отсутствие интерференции матрицы образца. Тестируемые образцы были отрицательными при анализе IPC в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции, что указывает на отсутствие перекрестного загрязнения между положительным контролем и образцом, и также тестируемые образцы были отрицательными при анализе BPV-3 в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции, что указывает на отсутствие ДНК BPV-3. В совокупности результаты анализа BPV-3 указывают на то, что имело место

удовлетворение и соответствие критериям приемлемости анализа и образца, а тестируемые образцы были валидными и "отрицательными" в отношении ВРV-3.

Таблица 18. Результаты для образцов FBS

Контроли qPCR- реакций /образцы	Анализ ВРV-3, СТ			Анализ ІРС, СТ			Результаты ВРV-3/ІРС
Контроль без матрицы (NTC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ /ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Отрицательный контроль экстракции (NEC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль экстракции (PEC)	28,84	28,89	28,72	28,04	28,22	28,33	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль (PC)	28,18	29,12	29,33	28,34	28,43	28,78	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Контроль ингибирования (ІНН)	29,96	29,97	30,16	n/a			ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Интерференция матрицы образца (ΔСТ)	1,15			n/a			Удовлетворяет
Тестируемый образец	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Критерии пригодности системы и приемлемости анализа				Соответствует			
Критерии приемлемости результатов для образцов				Соответствует			

Результаты для тестируемого образца	Валидный и отрицательный
-------------------------------------	--------------------------

Таблица 19. Результаты для облученной FBS №1

Контроли qPCR- реакций/обр азцы	Анализ ВРV-3, СТ			Анализ IРС, СТ			Результаты ВРV-3/IРС
	Контроль без матрицы (NTC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	
Отрицательный контроль экстракции (NEC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль экстракции (PEC)	28,00	28,06	27,87	27,16	27,16	27,41	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль (PC)	27,70	28,72	28,78	28,10	28,39	28,55	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Контроль ингибирования (IHN)	28,42	28,87	29,00	n/a			ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Интерференция матрицы образца (ΔСТ)	0,36			n/a			Удовлетворяет
Тестируемый образец	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Критерии системы анализа	пригодности и приемлемости		Соответствует				
Критерии	приемлемости		Соответствует				

результатов для образцов	
Результаты для тестируемого образца	Валидный и отрицательный

Таблица 20. Результаты для охарактеризованной FBS

Контроли qPCR- реакций/обр азцы	Анализ ВРV-3, СТ			Анализ ІРС, СТ			Результаты ВРV-3/ІРС
Контроль без матрицы (NTC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Отрицательный контроль экстракции (NEC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль экстракции (PEC)	28,48	28,72	28,57	28,01	28,33	27,95	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль (PC)	28,95	29,46	29,24	28,67	28,71	28,63	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Контроль ингибирования (ІНН)	29,03	28,74	29,29	n/a			ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Интерференция матрицы образца (ΔСТ)	0,19			n/a			Удовлетворяет
Тестируемый образец	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Критерии пригодности системы и приемлемости анализа				Соответствует			

Критерии приемлемости результатов для образцов	Соответствует
Результаты для тестируемого образца	Валидный и отрицательный

Результаты анализа ВРV-3 для положительных тестируемых образцов (двух необработанных не соответствующих GMP образцов собранного материала, содержащих FBS, и двух образцов FBS (FBS № 2 и FBS № 3) показаны в таблицах 21-24. Валидность анализа была продемонстрирована по результатам для аналитических контролей, включая ожидаемые с отрицательными результатами для NTC и NEC в анализах ВРV-3 и ИРС в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции и обнаружение целевого сигнала амплификации в РС в анализе ВРV-3 в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции.

Если тестируемый образец демонстрировал положительный сигнал амплификации и обнаружение ВРV-3, то оценка тестируемого образца с добавкой (ИНС) и ΔСТ становилась нерелевантной и не должна была рассматриваться как часть критериев приемлемости анализа. Обнаружение сигнала амплификации в анализе ВРV-3 и анализах ИРС для РС в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции указывало на точную эффективность экстракции; отрицательный сигнал тестируемого образца в анализе ИРС в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции указывал на отсутствие перекрестного загрязнения между положительным контролем и образцом. Тестируемый образец показывал положительный сигнал амплификации в анализе ВРV-3 в 3 из 3 повторностей ПЦР-реакции, что указывает на наличие ДНК ВРV-3. В совокупности результаты указывали на то, что имело место удовлетворение и соответствие критериям приемлемости анализа и образца, а тестируемый образец был валидным и положительным в отношении ВРV-3.

Таблица 21. Результаты для необработанного не соответствующего GMP образца 1 собранного материала

Контроли qPCR-реакций/образцы	Анализ ВРV-3, СТ			Анализ ИРС, СТ			Результаты ВРV-3/ИРС
Контроль без матрицы (NTC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Отрицательный контроль экстракции (NEC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Положительный контроль экстракции (PEC)	28,39	28,46	28,14	27,81	27,91	27,68	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль (PC)	28,49	28,42	28,35	28,15	28,02	28,06	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Контроль ингибирования (IHN)	n/a			n/a			n/a
Интерференция матрицы образца (ΔCT)	n/a			n/a			n/a
Тестируемый образец	29,36	29,21	29,52	40,00	40,00	40,00	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Критерии пригодности системы и приемлемости анализа	Соответствует						
Критерии приемлемости результатов для образцов	Соответствует						
Результаты для тестируемого образца	Валидный и положительный						

Таблица 22. Результаты для необработанного не соответствующего GMP образца 2 собранного материала

Контроли qPCR-реакций/образцы	Анализ BPV-3, CT			Анализ IPC, CT			Результаты BPV-3/IPC
Контроль без матрицы (NTC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

матрицы (NTC)							ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Отрицательный контроль экстракции (NEC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль экстракции (PEC)	28,39	28,43	28,52	27,87	27,93	28,12	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль (PC)	28,21	28,25	28,44	28,13	27,91	27,95	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Контроль ингибирования (IHN)	n/a		n/a		n/a		n/a
Интерференция матрицы образца (ΔСТ)	n/a		n/a		n/a		n/a
Тестируемый образец	21,31	21,43	21,53	40,00	40,00	40,00	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Критерии пригодности системы и приемлемости анализа	Соответствует						
Критерии приемлемости результатов для образцов	Соответствует						
Результаты для тестируемого образца	Валидный и положительный						

Таблица 24. Результаты для FBS № 3

Контроли qPCR-реакций/обр	Анализ ВРV-3, СТ	Анализ IPC, СТ	Результаты ВРV-3/PC
----------------------------------	-------------------------	-----------------------	----------------------------

азцы							
Контроль без матрицы (NTC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Отрицательный контроль экстракции (NEC)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль экстракции (PEC)	28,47	28,58	28,61	28,08	28,10	28,29	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Положительный контроль (PC)	28,45	28,44	28,40	27,83	27,89	27,69	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
Контроль ингибирования (INH)	n/a			n/a			n/a
Интерференция матрицы образца (ΔCT)	n/a			n/a			n/a
Тестируемый образец	24,98	25,09	25,22	40,00	40,00	40,00	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
Критерии пригодности системы и приемлемости анализа				Соответствует			
Критерии приемлемости результатов для образцов				Соответствует			
Результаты для тестируемого образца				Валидный и положительный			

Сходимость

Для тестирования сходимости экстрагированную ДНК из клеток ВНК и Vero (30 нг/ПЦР-реакция) получали без добавок либо с добавлением 25 геномных копий плазмиды

положительного контроля BPV-3_IPC (добавляемой на уровне SLOD). Анализ обнаружения BPV-3 (описанный в примере 2) проводили в 12 повторностях ПЦР-реакции в разные дни.

Критерий приемлемости данной процедуры требовал, чтобы по меньшей мере 11 из 12 повторностей не показывали сигнала амплификации для образцов без добавок в анализах BPV-3 и IPC методом qPCR, и по меньшей мере 11 из 12 образцов показали положительный сигнал амплификации для образцов с добавками в анализах BPV-3 и IPC методом qPCR. Результаты анализа сходимости выявили, что 12 из 12 образцов без добавок (таблица 25) и с добавками (таблица 26) удовлетворяли критериям приемлемости, демонстрируя сходимость анализа обнаружения BPV-3.

Таблица 25. Сходимость qPCR BPV-3 на тестируемых образцах без добавок

Образец	Повторности ПЦР-реакции	Анализ из BPV-3, СТ	Анализ IPC, СТ	Соотношение отрицательных сигналов	Отрицательный сигнал, %	Результаты анализа BPV-3 и IPC методом qPCR
Vero	12	40,00	40,00	12 из 12	100	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует
ВНК	12	40,00	40,00	12 из 12	100	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ/ Соответствует

Таблица 26. Внутри- и межаналитическая сходимость результатов qPCR BPV-3 на тестируемом образце с добавкой в два разных дня

Образец с добавкой (25 GC/ПЦР-реакция)						
Анализ	BPV-3, СТ				IPC, СТ	
Матрица образца	ВНК		Vero		ВНК	Vero
Повторности и воспроизведения ПЦР-реакций	День 1	День 2	День 1	День 2	Один прогон	
Повторность 1	34,30	34,84	34,63	34,83	33,76	34,44
Повторность 2	34,59	34,22	35,17	34,71	34,17	34,95
Повторность 3	34,47	35,22	35,14	34,91	34,65	34,18
Повторность 4	34,97	34,50	34,68	34,75	32,81	34,32
Повторность 5	34,21	34,09	34,86	35,38	34,24	34,30
Повторность 6	33,23	34,29	35,95	34,04	33,71	33,96
Повторность 7	34,85	34,62	35,69	35,96	32,91	34,44
Повторность 8	33,66	34,18	35,03	34,44	33,99	34,60
Повторность 9	34,28	33,96	34,72	36,55	33,92	34,05

Повторность 10	34,41	34,78	34,17	34,78	34,17	34,19
Повторность 11	34,47	34,20	34,14	34,29	33,83	34,32
Повторность 12	34,94	34,25	34,46	36,01	33,68	34,16
Соотношение положительных сигналов	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
% положительных сигналов	100	100	100	100	100	100
Результаты	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/Соответствует	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/Соответствует	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/Соответствует	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/Соответствует	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/Соответствует	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ/Соответствует

Среднее значение для СТ	34,37	34,43	34,89	35,05	33,82	34,33
Стандартное отклонение для СТ	0,51	0,37	0,55	0,76	0,53	0,26
CV, %	1,48	1,07	1,58	2,18	1,55	0,77

В целом, все тестируемые образцы удовлетворяли требованиям квалификационных характеристик для качественного анализа, включая специфичность, предел обнаружения, робастность и сходимость. Квалифицированный анализ обнаружения BPV-3 обеспечивает возможность робастного обнаружения 25 геномных копий BPV-3 на ПЦР-реакцию. Все тестируемые образцы удовлетворяли предложенным критериям пригодности системы и приемлемости анализа, а также критериям приемлемости тестируемого образца. Таким образом, квалифицированный анализ BPV-3 методом ПЦР в режиме реального времени обеспечивал обнаружение ДНК BPV-3 в тестируемом образце.

Пример 4. Анализ парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Получение образцов

В случае с тестируемыми образцами, содержащими клетки, перед экстракцией ДНК клетки подвергали низкоскоростному центрифугированию (LSC) при 320 x g в течение 10 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость собирали для экстракции ДНК. Образцы, не содержащие клеток, подвергали незамедлительной обработке.

К 250 мкл тестируемого образца добавляли 10 мкл смеси ферментов RNase Cocktail™ (Thermo Fisher, Карлсбад, Калифорния) и 0,5 М EDTA, pH 8,0 в виде смеси (9

мкл:1 мкл). Для экстракции 200 мкл тестируемого образца применяли систему для экстракции нуклеиновых кислот AutoMate Express™ (ThermoFisher). На AutoMate для процедуры экстракции ДНК выбирали протокол PrepSEQ (PS) Express 1-2-3 со следующими параметрами: 1-часовое расщепление протеиназой К (ПК) и элюирование 100 мкл. Экстрагированную ДНК визуально осматривали, и если в элюированной ДНК оставались какие-либо магнитные гранулы, использовали настольную рабочую станцию DynaMag™-2 Magnet (ThermoFisher) для удаления каких-либо оставшихся гранул в элюированной ДНК. ДНК использовали сразу или хранили при -20С.

Наряду с тестируемыми образцами контрольная плаزمида BPV-3_IPC (PEC) и отрицательный контроль экстракции (NEC) были также получены и прогнаны, как описано выше. Для положительного контроля экстракции к 250 мкл стерильного 1X фосфатно-солевого буфера (PBS) добавляли 62000 геномных копий (GC) плазмидной ДНК BPV-3_IPC. Это использовали для оценивания эффективности экстракции ДНК в ходе получения тестируемого образца и проверки того, что анализ не дает ложноотрицательных результатов. При предположении о 100% эффективности экстракции ДНК конечная элюированная ДНК должна содержать 500 GC/мкл. Для отрицательного контроля экстракции использовали ~ 300 нг геномной ДНК человека в 1X PBS. NEC использовали для отслеживания перекрестного загрязнения в ходе экстракции нуклеиновых кислот и проверки того, что анализ не давал ложноположительных результатов с неспецифической фоновой ДНК.

Получение других аналитических контролей

Контроль без матрицы (NTC): содержал все реагенты для ПЦР, кроме ДНК-матрицы. Он использовался в качестве отрицательного контроля для проверки отсутствия загрязнения ДНК в исходных материалах для qPCR.

Положительный контроль (PC): были включены три концентрации PC: 2E4, 2E5 и 2E7 GC/реакция плазмидной ДНК положительного контроля BPV-3_IPC. Это использовали для проверки того, что компоненты qPCR работают точно и должны иметь сигнал ПЦР-амплификации, специфичный для последовательности-мишени.

Положительный контроль экстракции (PEC): ~ 400 нг геномной ДНК человека (~ 3 мкл) добавляли к 250 мкл 1x PBS, а также добавляли 62500 копий плазмидной ДНК положительного контроля BPV-3_IPC (6,25 мкл) с последующей экстракцией.

Контроль ингибирования (INH): содержит экстрагированную ДНК из тестируемого образца, к которой добавлена плазмидная ДНК BPV-3_IPC при 2E4 GC/реакция. Это используется для определения уровня интерференции/ингибирования образца.

Стандарт (ST): 10-кратное разведение плазмидной ДНК BPV-3_IPC (1E8, 1E7, 1E6, 1E5, 1E4, 1E3 GC/реакция), используемое для определения эффективности ПЦР, линейного диапазона и количественного определения абсолютного числа копий последовательности-мишени в тестируемом образце/контроле.

Средства для организации анализа для обнаружения BPV-3 методом qPCR и IPC методом qPCR

Средства для организации анализа обнаружения ВРV-3 методом qPCR содержали набор праймеров/зондов ВРV-3 v3.0 для обнаружения ДНК ВРV-3 в тестируемом образце и набор праймеров/зондов IPC v2.0 для отслеживания любого случайного перекрестного загрязнения между положительными образцами и отрицательными образцами. Были получены два различных мастер-микса: мастер-микс для qPCR ВРV-3 и мастер-микс для qPCR IPC.

Мастер-микс с праймерами/зондами ВРV-3 v3.0 содержал праймеры/зонды ВРV-3 v3.0, воду и универсальный мастер-микс для ПЦР 2X TAQMAN[®] (Applied Biosystems). Мастер-микс TAQMAN[®] содержал необходимые компоненты для qPCR-реакции, в том числе оптимизированные буферы для амплификации G/C-богатой последовательности, dNTP с dUTP, ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold[™], краситель ROX (в качестве пассивного внутреннего эталона) и UNG AmpErase[™] (фермент урацил-ДНК-гликозилазу для устранения загрязнения при переносе продуктами ПЦР, содержащими dU). В таблице 27 приведено количество каждого компонента реакции для каждого образца, подвергаемого тестированию: тестируемого образца и пяти контролей - отрицательного контроля экстракции (NEC), контроля без матрицы (NTC), положительного контроля экстракции (PEC), контроля ингибирования (INH) и положительного контроля (PC).

Таблица 27. Компоненты реакции для количественного анализа ВРV_3 v3.0

Реагент	Исходная концентрация	Концентрация в реакции
Набор праймеров/зондов ВРV-3 v3.0, ID анализа: AP47Y2C	60X	1X
Набор праймеров/зондов IPC v2.0, ID анализа: APGZJVP	60X	1X
Универсальный мастер-микс для ПЦР ABI TaqMan 2X	2X	1X
Экстрагированная ДНК из тестируемого образца	n/a	10 мкл
Геномная ДНК человека	Переменная	~ 300 нг
Стандарт/Контроли	n/a	Переменная
Вода	n/a	до 30 мкл

Каждую реакцию для образцов и контролей проводили в трех повторностях (3 лунки) в 96-луночном реакционном планшете. Организацию qPCR-реакции можно проводить вручную или с помощью робота для манипуляции с жидкостями, такого как устройство для манипуляции с жидкостями QIAgility NEPA/UV (Qiagen, Inc., Джермантаун, Мэриленд). Для размещения реакционных смесей для qPCR использовали 96-луночный планшет MicroAmp Optical (Applied Biosystems), который затем покрывали оптической адгезивной пленкой MicroAmp (Applied Biosystems). Количество реагирующих компонентов ПЦР, образца и контролей в каждой ПЦР-реакции приведено в

таблицах 27 и 28. Размещение образцов на 96-луночных планшетах может быть организовано для каждого аналитика, а запечатанный планшет загружен в систему для проведения ПЦР в режиме реального времени QuantStudio™ 7 Flex (Applied Bioscience).

Для проведения qPCR-реакций использовали систему для проведения ПЦР в режиме реального времени QuantStudio™ 7 Flex (Applied Bioscience). В программе термоциклирования устанавливали следующие значения времени и температуры реакции: 50°C - 2 мин. (активация UNG AmpErase™), 95°C - 10 мин. (активация ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold™/денатурация) и 40 циклов по 95°C - 15 с, 60°C - 1 мин. (отжиг/удлинение/сбор данных). В таблице 28 приведены выбранные экспериментальные свойства.

Таблица 28. Экспериментальные свойства в программном обеспечении QuantStudio™ для qPCR BPV-3 и IPC

<i>Название экспериментального свойства</i>	<i>Выбранное экспериментальное свойство</i>
<i>Прибор</i>	<i>Система QuantStudio™ 7 Flex</i>
<i>Форма</i>	<i>96-луночный (0,2 мл)</i>
<i>Эксперимент</i>	<i>Стандартная кривая</i>
<i>Реагент</i>	<i>Реагенты TAQMAN®</i>
<i>Свойства прогона</i>	<i>Стандартные</i>
<i>Репортер</i>	<i>- FAM (для набора праймеров/зондов BPV-3 v3.0) - VIC (для набора праймеров/зондов IPC v2.0)</i>
<i>Гаситель</i>	<i>MGB-NFQ</i>
<i>Пассивный краситель</i>	<i>ROX</i>
<i>Пороговое значение</i>	<i>- ΔRn 0,1 для анализа BPV-3 - ΔRn 0,2 для анализа IPC</i>
<i>Исходный уровень</i>	<i>Устанавливается автоматически</i>
<i>Реакционный объем</i>	<i>30 мкл</i>

В анализе использовали систему для проведения ПЦР в режиме реального времени QS7 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) в комбинации с праймерами и зондами для BPV_3 и IPC, описанными в данном документе.

Чтобы анализ считался валидным анализом, он должен удовлетворять следующим критериям приемлемости анализа, см. таблицу 29. Если какие-либо из критериев приемлемости анализа не удовлетворены, анализ следует повторить.

Таблица 29. Критерии приемлемости валидных анализов

BPV_3	
Контроль	Критерии приемлемости валидных анализов
Контроль без	Минимум 2 из 3 реакций должны показать отсутствие сигнала

матрицы Отрицательный контроль экстракции	амплификации, $CT=40,00$ (неопределенное), и полученное среднее значение количества GC на реакцию (если таковое имеется) должно быть меньше, чем LOD95% анализа (27 GC/реакция). Любое значение CT, представленное как "неопределенное", означает отсутствие ДНК и может быть преобразовано в 40,00 для статистического анализа.
Положительный контроль экстракции	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации $CT < 40,00$, и полученное среднее значение количества GC на реакцию должно превышать LOQ анализа (1E3 GC/txn).
Положительный контроль РС 2E4 РС 2E5 РС 2E7	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации $CT < 40,00$, и полученное среднее значение количества GC на реакцию должно удовлетворять установленным критериям точности анализа $\pm 30\%$ от эталонного значения для РС: РС_2E7, диапазон приемлемой точности: от 1,4E7 до 2,6E8 GC/txn РС_2E5, диапазон приемлемой точности: от 1,4E5 до 2,6E6 GC/txn РС_2E4, диапазон приемлемой точности: от 1,4E4 до 2,6E4 GC/txn
Контроль ингибирования (INH или +S)	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации $CT < 40,00$, и полученное среднее значение количества GC на реакцию должно находиться в пределах одного порядка величины от исходного уровня концентрации с добавкой (2E4); среднее значение количества GC для INH должно находиться в пределах от 2E3 до 2E5 GC/реакция. Контроль INH является нерелевантным и не применяется, если тестируемый образец является положительным в отношении ВРV-3 со средним количеством GC, равным или превышающим 2E4 на реакцию.
Стандарт	- Коэффициент корреляции (R^2) $\geq 0,98$ - Эффективность ПЦР-амплификации в пределах 90-110%.
IPC	
Контроль	Критерии приемлемости валидных анализов
Отрицательный контроль экстракции	Минимум 2 из 3 реакций должны показать отсутствие сигнала амплификации, $CT=40,00$ (неопределенное).
Положительный	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации CT

контроль экстракции	< 40,00, если ИРС является последовательностью-мишенью.
Тестируемый образец	Минимум 2 из 3 реакций должны показать отсутствие сигнала амплификации, СТ=40,00 (неопределенное), если ИРС является последовательностью-мишенью.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft, Редмонд, Вашингтон) и/или программного обеспечения TIBCO SPOTFIRE® (Пало-Альто, Калифорния). Любое значение СТ, представленное как "неопределенное", означало отсутствие ДНК-мишени и преобразовывалось в 40,00 для дальнейшего статистического анализа. Образец, стандарт и контроли тестировали в 3 повторностях. Правило определения выбросов, основанное на критерии Граббса или Q-критерии Диксона, может быть применено к значениям СТ из образцов, контролей или стандартов. Критерий анализа выбросов может быть применен к точкам данных в трех повторностях, чтобы определить, может ли один из результатов быть исключен из анализа как выброс. Если исключение выбросов является статистически значимым (уровень значимости: $\alpha=0,05$) и допустимым, необходимо повторить анализ данных с валидными результатами в двух повторностях. Результаты, основанные на точках данных в двух повторностях, должны удовлетворять всем критериям приемлемости для контролей и стандарта, чтобы считаться валидными. При определении выброса используется двусторонний критерий с уровнем значимости альфа 0,05; тестирование может быть проведено с помощью онлайн- или оффлайн-ресурсов, известных специалистам в данной области. Примеры предоставления и интерпретации данных приведены в таблице 30.

Таблица 30. Предоставление и интерпретация данных

Тестируемый образец (GC BPV-3/гхп)	Предоставление	Интерпретация
Значение СТ BPV-3 было неопределенным (СТ=40,00), что указывает на отсутствие BPV-3, или среднее значение GC/гхп BPV-3 равнялось или было меньше LOD95% анализа (27 GC/гхп)	BPV-3 не обнаружен	Последовательность-мишень не обнаружена или обнаружена на уровне ниже LOD95% анализа.
Среднее значение GC/гхп BPV-3 было меньше LOQ анализа (1Е3) и больше LOD95% анализа (27	BPV-3 обнаружен (количество представлено как Log10 среднего значения \pm стандартное	Последовательность-мишень была обнаружена, но на уровне ниже LOQ анализа; не поддается точному

GC/rxn)	отклонение на мл)	количественному определению.
Среднее значение GC/rxn BPV-3 было в пределах динамического диапазона анализа (от 1Е3 до 1Е8 GC/rxn)	BPV-3 обнаружен (количество представлено как Log10 среднего значения ± стандартное отклонение на мл)	Последовательность-мишень была обнаружена, а количественное определение было точным и находилось в пределах линейного диапазона анализа.
Среднее значение GC/rxn для BPV-3 превышало верхнюю установленную точку (1Е8) динамического диапазона анализа	BPV-3 обнаружен (количество представлено как Log10 среднего значения ± стандартное отклонение на мл) В качестве альтернативы количество может быть представлено как превышающее верхний предел динамического диапазона анализа.	Последовательность-мишень была обнаружена в количестве, превышающем верхнее значение динамического диапазона анализа. Анализ можно повторять с различными коэффициентами разведения, чтобы обеспечить возможность количественного определения в пределах рабочего диапазона.

Пример 5. Квалификация количественного анализа

Критерии приемлемости результатов для тестируемых образцов

Выполняли квалификацию количественного анализа. Были квалифицированы следующие параметры: специфичность, предел обнаружения (LOD), линейность, динамический диапазон, прецизионность, включая сходимость (внутрианалитическую специфичность) и промежуточную прецизионность (внутрилабораторную прецизионность), точность, предел количественного определения (LOQ) и робастность, а также определена верификация анализа.

Специфичность: эффект матрицы образца (для тестирования на отсутствие ложноположительных результатов)

Чтобы продемонстрировать, что анализ не дает ложноположительных результатов (ошибки, при которой qPCR неверно дает положительный результат при отсутствии последовательности-мишени), были протестированы следующие матрицы образцов.

Тестируемые клеточные линии: PG4 (головной мозг кошки, трансформированный вирусом саркомы Молони), Vero (почка африканской зеленой мартышки), 324К (почка

новорожденного человека, трансформированная SV40), L929 (клеточная линия фибробластов мыши), СНО (яичник китайского хомячка), НЕК293 (эмбриональная почка человека), MDBK (клетки Мадин-Дарби почки крупного рогатого скота), NRK (нормальная почка крысы), лейкоциты человека (Promega, Сан-Луис-Обиспо, Калифорния). Тестируемые среды: DMEM, МакКоя 9А, Хэма F12. Тестируемые сыворотки животных: фетальная бычья сыворотка и лошадиная сыворотка.

Критерий приемлемости требовал, чтобы все тестируемые образцы показывали отрицательный результат в по меньшей мере 5 из 6 повторностей ПЦР. В 6 из 6 повторностей не было обнаружено ни одного ложноположительного результата.

Специфичность: обнаружение BPV-3 (для тестирования отсутствия ложноотрицательных результатов)

Чтобы продемонстрировать, что анализ не дает ложноотрицательных результатов (ошибки, при которой qPCR неверно показывает отрицательный результат в присутствии последовательности-мишени), к вышеупомянутым клеточным линиям, средам и сывороткам животных добавляли плазмиду положительного контроля BPV-3 (50000 геномных копий/200 мкл образца) с последующей экстракцией ДНК и анализом BPV-3 методом qPCR, как описано в примере 4. Критерии приемлемости требовали, чтобы по меньшей мере 5 из 6 повторностей показали положительный результат. Все тестируемые образцы демонстрировали, что в 6 из 6 повторностей обнаруживался BPV-3. Ложноотрицательных результатов обнаружено не было.

Специфичность: перекрестная реактивность

Для определения перекрестной реактивности в анализе близкородственные виды/изоляты вирусов оценивали в отношении эксклюзивности и инклюзивности.

Эксклюзивность демонстрировала, что в анализе не обнаруживались нецелевые виды/изоляты вирусов, близкородственные последовательности-мишени. Вирусы BPV-1 (парвовирус крупного рогатого скота 1 типа, VR-767TM в АТСС[®], Манассас, Вирджиния), BPV-2 (парвовирус крупного рогатого скота 2 типа) и ММVp (прототип мелкого вируса мышей) экстрагировали, как описано выше. Поскольку BPV-2 не является коммерчески доступным, полноразмерную последовательность неструктурного (NS) гена BPV-2 (номер доступа в GenBank: NC_006259) синтезировали и клонировали в плазмиду и проверяли посредством секвенирования. Плазмиду использовали как эталонный изолят BPV-2 с концентрацией 1Е6 GC на ПЦР-реакцию.

Виды/изоляты вирусов использовались в анализе BPV-3 методом qPCR, как описано в примере 4. Критерий приемлемости требовал, чтобы все тестируемые образцы показывали отрицательный результат в по меньшей мере 5 из 6 повторностей. Результаты qPCR BPV-3 не демонстрировали какой-либо перекрестной реактивности с этими близкородственными видами и удовлетворяют критериям приемлемости, при этом в 6 из 6 повторностей не были обнаружены нецелевые виды/изоляты.

Инклюзивность демонстрирует, что анализ может обеспечивать специфичное обнаружение видов/изолятов BPV-3 с последовательностью-мишенью. Ранее

подтвержденный положительный по BPV-3 образец фетальной бычьей сыворотки (подтверждение было проведено путем секвенирования полноразмерного генома BPV-3) был экстрагирован с последующим анализом BPV-3 методом qPCR. Критерий приемлемости данной процедуры требовал, чтобы тестируемый образец показывал положительный результат в по меньшей мере 5 из 6 повторностей. Результаты анализа BPV-3 методом qPCR демонстрировали специфичное обнаружение ДНК BPV-3 и соответствовали критериям приемлемости, при этом в 6 из 6 повторностей были обнаружены целевые изоляты.

Предел обнаружения (LOD)

Предел обнаружения (LOD) представляет собой наименьшее количество последовательности-мишени, которое может быть обнаружено, но не обязательно количественно выражено в виде точного значения. Для определения LOD анализа использовали пробит-анализ с использованием подхода предела обнаружения LOD95%. LOD95% представляет собой число копий последовательности ДНК-мишени, необходимое для обеспечения 95% вероятности обнаружения (POD) в анализе методом qPCR.

ДНК BPV-3 положительного контроля (1000, 100, 50, 25, 20, 10, 5 и 1 геномная копия/реакция) добавляли к экзогенной выделенной ДНК (~ 300 нг геномной ДНК человека) и тестировали с помощью анализа BPV-3 методом qPCR, как описано в примере 4. Каждую концентрацию тестировали в 12 повторностях ПЦР для получения статистически достоверной кривой POD, на основании которой выводили LOD95% с 95% доверительным интервалом (CI). Эксперимент повторяли 3 разных аналитика. Любое значение $CT \leq 39,99$ считалось положительным сигналом, а любое неопределенное значение CT ($CT=40,00$) считалось отрицательным сигналом. 36 установленных точек для каждой концентрации (собранные от всех аналитиков) были получены для пробит-анализа, чтобы построить статистически достоверную кривую POD, на основании которой выводили LOD95% с 95% доверительным интервалом (CI), см. таблицу 31 и фигуру 2. Результаты пробит-анализа показали, что LOD95% анализа BPV-3 методом qPCR составляет 27 GC/гxn с 95% доверительным интервалом от 22 до 34 GC/гxn.

Таблица 31. Результат LOD95% из всех экспериментов

Концентрация (GC/гxn)	ДНК	Н повторностей ПЦР во всех экспериментах	Н положительных сигналов ПЦР, $CT \leq 39,99$
1		36	4
5		36	14
10		36	26
20		36	34
25		36	33
50		36	35

100	36	36
1000	36	36

Динамический диапазон и линейность

В динамическом диапазоне аналитической процедуры должен быть продемонстрирован подходящий уровень прецизионности, точности и линейности. Для оценивания линейности, минимального и максимального значения динамического (рабочего) диапазона стандартной кривой была построена предварительная стандартная кривая и оценена при концентрациях, охватывающих 8 порядков величины с определенным числом копий плазмиды положительного контроля. В анализе BVP-3 использовали три повторности при каждой из 1E8, 1E7, 1E6, 1E5, 1E4, 1E3, 1E2 и 1E1 геномных копий/реакция.

Для рабочего диапазона было отобрано минимум 6 порядков величины не только в соответствии с назначением анализа и предполагаемым применением, но и с учетом приемлемых рабочих параметров стандартной кривой, полученных по результатам предварительного тестирования. Для этой процедуры линейность стандартной кривой в пределах 6 выбранных порядков величины (включая максимальные и минимальные установленные точки) должна удовлетворять критериям приемлемости: (i) коэффициент корреляции (R^2) $\geq 0,98$ и (ii) эффективность амплификации ПЦР в пределах 90-110%.

Хотя динамический диапазон при семи установленных точках (от 1E2 до 1E8 геномных копий/реакция) соответствовал критериям приемлемости анализа, предполагалось, что использование семи установленных точек от 1E2 до 1E8 в качестве минимального и максимального значения стандартного диапазона не будет робастным. Поэтому была выбрана более высокая точка (1E3) в качестве нижнего предела количественного определения (LOQ), а минимальное и максимальное значение динамического диапазона стандартной кривой были определены среди шести установленных точек данных от 1E3 до 1E8 геномных копий/реакция, см. таблицу 32.

Таблица 32. Динамический диапазон и рабочие характеристики стандартной кривой

Эксперимент	Динамический диапазон	Коэффициент корреляции (R^2)	Эффективность ПЦР-амплификации (%)	Критерии приемлемости $R^2 \geq 0,98$ Эффективность ПЦР: 90-110%
1	от 1E1 до 1E8	0,997	91,328	Удовлетворяются
	от 1E2 до 1E8	0,999	95,572	Удовлетворяются
	от 1E3 до 1E8	0,999	94,312	Удовлетворяются
2	от 1E1 до 1E8	0,997	94,957	Удовлетворяются
	от 1E2 до 1E8	0,998	97,441	Удовлетворяются

	от 1Е3 до 1Е8	1,000	93,731	Удовлетворяются
3	от 1Е1 до 1Е8	0,995	85,425	Не удовлетворяются
	от 1Е2 до 1Е8	0,998	90,827	Удовлетворяются
	от 1Е3 до 1Е8	1,000	94,630	Удовлетворяются

Точность и прецизионность

Определялись точность (истинность) и прецизионность (сходимость и промежуточную прецизионность) анализа. Для определения точности и прецизионности получали два отдельных набора плазмид положительного контроля с определенным диапазоном и числом геномных копий ВРV-3 (1Е8, 1Е7, 1Е6, 1Е5, 1Е4 и 1Е3 геномных копий/реакция) и тестировали их параллельно в одном 96-луночном реакционном планшете для ПЦР, выполняя анализ ВРV-3. Один набор служил в качестве стандартных эталонных установленных точек, а другой набор использовался для оценивания анализа. Эту процедуру тестировали три разных аналитика в разные дни.

Для определения сходимости (внутрианалитической прецизионности) среднее значение и стандартное отклонение количества (геномных копий последовательности-мишени/реакция) и % CV (коэффициент вариации) количества рассчитывали из каждой реакции в трех повторностях при каждой концентрации. Критерием приемлемости данной процедуры было то, что % CV количества составлял $\leq 25\%$.

Для определения промежуточной прецизионности (внутрилабораторной прецизионности) среднее значение и стандартное отклонение количества и % CV рассчитывали из всех ПЦР-реакций в трех повторностях при всех концентрациях в трех независимых экспериментах. Критерием приемлемости было то, что % CV количества составлял $\leq 30\%$.

Для определения точности (с учетом внутренне присущей вариабельности у разных аналитиков, выполняющих анализ, разных систем обнаружения и при выполнении анализа в разное время) среднее количество (геномных копий последовательности-мишени/реакция) рассчитывали из каждой ПЦР-реакции в трех повторностях при каждой концентрации (1Е8, 1Е7, 1Е6, 1Е5, 1Е4 и 1Е3). Критерием приемлемости было то, что % CV количества рассчитывали для каждой концентрации образца, описанной выше. Критерием приемлемости было то, что среднее количественно определенное значение находилось в пределах $\pm 30\%$ от эталонного значения во всем динамическом диапазоне анализа. Критерий приемлемости данной процедуры также требовал, чтобы линейность для каждого независимого эксперимента демонстрировала коэффициент корреляции (R^2) $\geq 0,98$ и эффективность амплификации ПЦР в пределах 90-110%.

Результаты 3 независимых прогонов показали, что анализ удовлетворяет установленным критериям линейности, см. таблицы 33-36. Сходимость составляла $\leq 25\%$, промежуточная прецизионность составляла $\leq 25\%$, а точность находилась в пределах $\pm 30\%$. Линейность также соответствовала критериям приемлемости с коэффициентом

корреляции (R^2) $\geq 0,98$ и эффективностью ПЦР-амплификации в пределах 90-110%.

Таблица 33. Прогон № 1: сходимость и точность первого эксперимента удовлетворяли критериям приемлемости

Название образца	СТ	Количество GC/гxn	Точность	Стандартное отклонение количества	Сходимость	Критерии приемлемости Точность: $\pm 30\%$ от стандарта Сходимость: $\% CV \leq 25\%$ $R^2 \geq 0,98$ Эффективность ПЦР: 90-110%
			Среднее значение количества (GC/гxn)		$\% CV$ количества	
PC_1E8	12,465	92,025,368	93,049,523	1,502,632	1,61	Удовлетворяются
	12,421	94,774,544				
	12,460	92,348,656				
PC_1E7	15,510	12,117,075	10,908,287	1,047,926	9,61	Удовлетворяются
	15,760	10,256,219				
	15,746	10,351,568				
PC_1E6	19,432	889,522	895,233	7,440	0,83	Удовлетворяются
	19,408	903,646				
	19,427	892,530				
PC_1E5	22,919	87,213	88,386	1,252	1,42	Удовлетворяются
	22,877	89,704				
	22,902	88,239				
PC_1E4	26,323	9,039	9,318	287	3,08	Удовлетворяются
	26,280	9,302				
	26,231	9,613				
PC_1E3	30,033	764	715	47	6,64	Удовлетворяются
	30,141	711				
	30,232	669				
Линейность	Коэффициент корреляции (R^2): 0,999 Эффективность ПЦР-амплификации: 94,312%					Удовлетворяются

Таблица 34. Прогон № 2: сходимость и точность второго эксперимента

удовлетворяли критериям приемлемости

Название образца	СТ	Количество GC/rxn	Точность		Сходимость	Критерии приемлемости Точность: $\pm 30\%$ от стандарта Сходимость: $\% CV \leq 25\%$ $R^2 \geq 0,98$ Эффективность ПЦР: 90-110%
			Среднее значение количества (GC/rxn)	Стандартное отклонение количества		
PC_1E8	12,051	95,262,496	94,595,301	917,893	0,97	Удовлетворяются
	12,079	93,548,496				
	12,056	94,974,912				
PC_1E7	15,515	9,642,861	9,573,740	64,503	0,67	Удовлетворяются
	15,535	9,515,152				
	15,527	9,563,208				
PC_1E6	18,915	1,017,622	1,031,438	16,246	1,58	Удовлетворяются
	18,869	1,049,335				
	18,901	1,027,357				
PC_1E5	22,457	97,816	94,600	2,821	2,98	Удовлетворяются
	22,541	92,543				
	22,526	93,441				
PC_1E4	25,229	15,640*	9,572	20	0,21	Удовлетворяются
	25,970	9,586				
	25,974	9,558				
PC_1E3	29,679	825	822	4	0,45	Удовлетворяются
	29,691	818				
	29,680	824				
Линейность	Коэффициент корреляции (R^2): 1,000 Эффективность ПЦР-амплификации: 93,731%					Удовлетворяются

* Это значение являлось выбросом в соответствии с Q-критерием Диксона и было исключено из анализа данных.

Таблица 35. Прогон № 3: сходимость и точность третьего эксперимента удовлетворяли критериям приемлемости

Название образца	СТ	Количество GC/гхп	Точность		Сходимость	Критерии приемлемости Точность: $\pm 30\%$ от стандарта Сходимость: $\% CV \leq 25\%$ $R^2 \geq 0,98$ Эффективность ПЦР: 90-110%
			Среднее значение количества (GC/гхп)	Стандартное отклонение количества		
PC_1E8	11,818	117,211,200	115,519,208	2,229,747	1,93	Удовлетворяются
	11,873	112,992,544				
	11,829	116,353,880				
PC_1E7	15,668	9,084,705	12,202,317	2,713,306	22,24	Удовлетворяются
	15,073	13,492,047				
	15,014	14,030,200				
PC_1E6	18,758	1,166,552	1,279,299	119,641	9,35	Удовлетворяются
	18,634	1,266,533				
	18,478	1,404,811				
PC_1E5	22,277	112,593	110,984	6,333	5,71	Удовлетворяются
	22,397	104,002				
	22,228	116,357				
PC_1E4	25,871	10,344	10,570	1,468	13,89	Удовлетворяются
	26,043	9,227				
	25,630	12,138				
PC_1E3	29,156	1,167	922	213	23,07	Удовлетворяются
	29,686	820				
	29,763	780				
Линейность	Коэффициент корреляции (R^2): 0,999 Эффективность ПЦР-амплификации: 94,312%					Удовлетворяются

Таблица 36. Результаты определения промежуточной прецизионности на основе 3 отдельных прогонов, проведенных разными аналитиками (прогоны № 1, 2 и 3)

образца			Среднее значение количества (GC/rxn)	отклоне ние количес тва	% CV количес тва	
PC_1E8	12,088	99,773,728	102,123,087	5355285	5,24	Удовлетворяют ся
	12,071	100,869,600				
	12,092	99,482,992				
	12,105	98,636,408				
	12,126	97,306,984				
	12,128	97,162,088				
	11,979	107,288,808				
	12,072	100,809,184				
	12,067	101,182,688				
	12,029	103,763,872				
	12,046	102,613,232				
11,854	116,587,456					
PC_1E6	19,376	781,088	995,748	109618	11,01	Удовлетворяют ся
	19,132	918,892				
	19,104	936,234				
	19,074	954,863				
	19,156	904,037				
	19,144	911,503				
	18,916	1,060,829				
	18,893	1,076,882				
	18,879	1,086,972				
	18,803	1,143,163				
	18,837	1,117,681				
18,921	1,056,834					
PC_1E4	25,953	9,815	10,475	2076	19,82	Удовлетворяют

	25,947	9,850				ся
	26,233	8,147				
	26,162	8,539				
	26,029	9,330				
	25,283	15,321				
	25,849	10,513				
	25,888	10,248				
	26,029	9,329				
	26,034	9,297				
	25,521	13,078				
	25,621	12,237				
PC_1E3	29,313	1,049	1,162	274	23,56	Удовлетворяют ся
	28,819	1,457				
	29,434	968				
	29,798	760				
	29,571	883				
	29,050	1,249				
	29,420	977				
	28,775	1,500				
	28,688	1,590				
	28,847	1,430				
	29,250	1,094				
	29,407	985				
Линейность	Коэффициент корреляции (R^2): 0,999 Эффективность ПЦР-амплификации: 94,544%					Удовлетворяют ся

Таблица 38. Прогон № 2: линейность, сходимость и точность второго эксперимента по определению LOQ удовлетворяли критериям приемлемости.

Название	СТ	§ 16.0.0	Точность	СТ КЛОНЕН	Сходимость	ХОДИМОСТЬ ..
----------	----	----------	----------	-----------	------------	--------------

образца			Среднее значение количества (ГС/гхп)		% CV количества	
PC_1E8	12,095	95,058,592	93,650,03 4	1,438,673	1,54	Удовлетворяют ся
	12,120	93,524,168				
	12,115	93,828,104				
	12,118	93,629,304				
	12,112	94,045,632				
	12,154	91,458,488				
	12,109	94,209,456				
	12,100	94,746,560				
	12,094	95,136,672				
	12,135	92,587,520				
	12,168	90,615,920				
	12,097	94,959,992				
PC_1E6	19,256	838,090	854,259	24,034	2,81	Удовлетворяют ся
	19,177	882,874				
	19,225	855,340				
	19,217	859,674				
	19,237	848,636				
	19,230	852,521				
	19,295	816,498				
	19,207	865,467				
	19,261	835,148				
	19,132	909,394				
	19,253	839,838				
	19,239	847,628				

PC_1E4	26,141	8,864	8,691	430	4,95	Удовлетворяют ся
	26,052	9,400				
	26,174	8,670				
	26,226	8,378				
	26,154	8,787				
	26,174	8,672				
	26,194	8,560				
	26,314	7,907				
	26,197	8,543				
	26,265	8,168				
	26,083	9,209				
	26,095	9,138				
PC_1E3	29,738	823	828	75	9,03	Удовлетворяют ся
	29,680	855				
	29,774	804				
	29,703	842				
	29,747	818				
	29,647	874				
	29,528	946				
	29,952	715				
	29,871	754				
	29,895	742				
	29,503	961				
	29,770	806				
Линейность	Коэффициент корреляции (R^2): 1,000 Эффективность ПЦР-амплификации: 93,621%				Удовлетворяют ся	

Таблица 39. Прогон № 3: линейность, сходимост и точность третьего эксперимента по определению LOQ удовлетворяли критериям приемлемости.

Название образца	СТ	Количество GC/г хл	Точность	ное отклонение	количество	Сходимость	стандартная	Сходимость: %	$CV \leq 25\%$
------------------	----	--------------------	----------	----------------	------------	------------	-------------	---------------	----------------

			Среднее значение количества (ГС/гxn)		% CV количества	
PC_1E8	11,987	87,553,632	86,941,879	1,185,070	1,36	Удовлетворяются
	12,009	86,286,488				
	12,016	85,904,016				
	11,983	87,763,088				
	11,996	87,037,040				
	11,987	87,556,344				
	11,976	88,172,408				
	12,015	85,993,864				
	11,958	89,230,456				
	12,034	84,890,344				
	12,012	86,159,392				
	12,001	86,755,472				
PC_1E6	19,003	919,457	869,476	39,354	4,53	Удовлетворяются
	19,096	865,214				
	19,106	859,918				
	19,088	869,696				
	19,140	841,225				
	19,095	866,096				
	19,091	868,491				
	19,138	842,210				
	19,174	822,775				
	18,935	960,591				
	19,168	826,054				
	19,049	891,982				

PC_1E4	26,388	7,597	9,014	1148	12,73	Удовлетворяются
	26,298	8,053				
	26,240	8,365				
	26,272	8,188				
	26,242	8,350				
	25,987	9,854				
	25,865	10,671				
	24,184	31781*				
	26,077	9,298				
	25,823	10,964				
	25,211	16316*				
	26,162	8,795				
PC_1E3	30,058	701	732	39	5,33	Удовлетворяются
	29,949	752				
	30,100	682				
	30,149	660				
	29,909	772				
	29,909	772				
	29,079	1,323*				
	29,114	1,294*				
	30,011	722				
	29,948	753				
	29,958	748				
	29,935	759				
Линейно сть	Коэффициент корреляции (R^2): 1,000 Эффективность ПЦР-амплификации: 91,443%					Удовлетворяются

* Значения являлись выбросами в соответствии с критерием IQR и были исключены из анализа данных.

Таблица 40. Результаты определения промежуточной прецизионности на основе 3 независимых экспериментов/прогонов по определению LOQ удовлетворяли критериям приемлемости.

Название образца	Среднее значение	Стандартное отклонение	Промежуточная прецизионность	Критерии приемлемости
------------------	------------------	------------------------	------------------------------	-----------------------

	количества (GC/rxn)	количества	% CV количества	Промежуточная прецизионность: % CV ≤ 30%
PC_1E8 Прогоны № 1, 2 и 3	94,238,333	7056365	7,49	Удовлетворяются
PC_1E6 Прогоны № 1, 2 и 3	906,494	92636	10,22	Удовлетворяются
PC_1E4 Прогоны № 1, 2 и 3	9,416	1583	16,81	Удовлетворяются
PC_1E3 Прогоны № 1, 2 и 3	918	250	27,19	Удовлетворяются

Робастность

Для определения робастности анализа изменения концентраций критически важных реагентов величиной до 20% оценивали в соответствии с способом Юдена-Штайнера (выше). Несколько критически важных факторов qPCR отбирали и подвергали незначительным изменениям, см. таблицу 41. Тестируемый образец фетальной бычьей сыворотки, положительный по BPV-3, экстрагировали и тестировали в 12 повторностях с использованием оптимизированных и измененных условий в анализе BPV-3 параллельно со стандартной кривой.

Таблица 41. Тестируемые факторы qPCR

Фактор ПЦР	№ условия с комбинированной матрицей				
	Оптимизированное условие	1	2	3	4
Мастер-микс для qPCR от Applied Biosystems	Партия А	Партия А	Партия А	Партия В	Партия В
Праймеры/зонды для BPV-3	Партия А	Партия А	Партия В	Партия В	Партия А

Концентрация праймеров/зондов для BPV-3	1x	1,2x	0,8x	1,2x	0,8x
Объем ПЦР-реакции (мкл)	30	25	25	35	35

Критерий приемлемости для этой процедуры требовал, чтобы ответ, полученный для любого условия робастности в отношении применяемых небольших изменений, соответствовал установленным критериям приемлемости анализа. Критерий приемлемости для данной процедуры включал точность, % CV количества для сходимости и промежуточной прецизионности составлял $\leq 25\%$, как описано выше. При определении точности среднее значение количества для условий с комбинированной матрицей (условий с 1 по 4) составляло $\pm 30\%$ от среднего значения количества для оптимизированного условия.

Результаты исследования робастности показали, что незначительные изменения в критически важных реагентах для qPCR были допустимы, и результаты определения робастности удовлетворяли критериям прецизионности и точности (118100 ± 35430) по сравнению с оптимизированным условием, см. таблицу 42.

Таблица 42. Сходимость и точность эксперимента по определению робастности удовлетворяли критериям приемлемости

Название образца	СТ	Количество GC/rxn	Точность	Стандартное отклонение количества	Сходимость	Критерии приемлемости Точность: $\pm 30\%$ от оптимизированного условия Сходимость: $\% CV \leq 25\%$ $R^2 \geq 0,98$ Эффективность ПЦР: 90-110%
			Среднее значение количества (GC/rxn)		% CV количества	
Оптимизированное условие	21,342	119,550	118,100	3359	2,84	Удовлетворяются
	21,347	119,099				
	21,345	119,303				
	21,400	114,637				
	21,357	118,231				
	21,402	114,449				

	21,388	115,630				
	21,413	113,586				
	21,381	116,243				
	21,288	124,286				
	21,301	123,106				
	21,347	119,083				
Условие робастности (1)	21,198	132,632	129,070	3071	2,38	Удовлетворяются
	21,229	129,739				
	21,261	126,719				
	21,248	127,949				
	21,265	126,411				
	21,283	124,755				
	21,274	125,541				
	21,247	128,075				
	21,216	130,993				
	21,204	132,088				
	21,177	134,715				
21,234	129,221					
Условие робастности (2)	21,582	100,455	97,559	4251	4,36	Удовлетворяются
	21,633	96,803				
	21,600	99,194				
	21,630	97,070				
	21,594	99,617				
	21,697	92,446				
	21,725	90,595				
	21,697	92,449				
	21,651	95,582				
	21,596	99,439				
	21,524	104,787				
21,558	102,275					
Условие робастности	21,230	129,609	124,259	5180	4,17	Удовлетворяются
	21,248	127,920				

(3)	21,283	124,744				
	21,278	125,207				
	21,369	117,245				
	21,324	121,089				
	21,351	118,724				
	21,349	118,902				
	21,357	118,260				
	21,246	128,132				
	21,227	129,892				
	21,211	131,381				
Условие робастности (4)	21,513	105,590	101,792	4841	4,76	Удовлетворяются
	21,547	103,024				
	21,526	104,609				
	21,575	100,966				
	21,618	97,889				
	21,633	96,866				
	21,648	95,779				
	21,626	97,330				
	21,621	97,667				
	21,544	103,268				
	21,490	107,378				
21,443	111,135					
Стандарт	Коэффициент корреляции (R^2): 0,987 Эффективность ПЦР-амплификации: 106,209%					Удовлетворяются

Верификация

Критерии пригодности системы анализа и приемлемости анализа определяли для проверки характеристик анализа в соответствии с квалификационным протоколом, см. таблицу 44. Для демонстрации того, что характеристики анализа соответствуют ожидаемым, тестируемый образец, содержащий последовательность-мишень (образец А), и тестируемый образец, не содержащий последовательность-мишень (образец В), подвергали экстракции ДНК с последующей qPCR ВРV-3. Верификацию тестировали 3 раза разные аналитики в разные дни. Аналитические контроли, критерии пригодности системы и приемлемости анализа, а также предоставление и интерпретация результатов тестирования показаны в таблицах 43-44.

Таблица 43. Определенные критерии пригодности системы и приемлемости анализа для анализа ВРV-3 методом qPCR

Последовательность-мишень ВРV-3	Контроль	Критерии приемлемости валидных анализов
ВРV-3	NTC NEC	Минимум 2 из 3 реакций должны показать отсутствие сигнала амплификации, $CT=40,00$ (неопределенное), и полученное среднее значение количества GC на реакцию (если таковое имеется) должно быть меньше, чем $LOD_{95\%}$ анализа (27 GC/реакция).
ВРV-3	PEC	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации $CT < 40,00$, и полученное среднее значение количества GC на реакцию должно превышать LOQ анализа ($1E3 \text{ GC/rxn}$).
ВРV-3	PC 2E4 PC 2E5 PC 2E7	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации $CT < 40,00$, и полученное среднее значение количества GC на реакцию должно удовлетворять установленным критериям точности анализа - $\pm 30\%$ от эталонного значения для PC: PC_2E7, диапазон приемлемой точности: от $1,4E7$ до $2,6E8 \text{ GC/rxn}$ PC_2E5, диапазон приемлемой точности: от $1,4E5$ до $2,6E6 \text{ GC/rxn}$ PC_2E4, диапазон приемлемой точности: от $1,4E4$ до $2,6E4 \text{ GC/rxn}$
ВРV-3	INH или (+S)	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации $CT < 40,00$, и полученное среднее значение количества GC на реакцию должно находиться в пределах одного порядка величины от исходного уровня концентрации с добавкой ($2E4$); среднее значение количества GC для INH должно находиться в пределах от $2E3$ до $2E5 \text{ GC/реакция}$. ПРИМЕЧАНИЕ: Контроль INH является нерелевантным и не применяется, если тестируемый образец является положительным в отношении ВРV-3

		со средним количеством GC, равным или превышающим 2E4 на реакцию.
BPV-3	ST	- Коэффициент корреляции (R^2) $\geq 0,98$ - Эффективность ПЦР-амплификации в пределах 90-110%.
Последовательность-мишень IPC	Контроль	Критерии приемлемости валидных анализов
IPC	NEC	Минимум 2 из 3 реакций должны показать отсутствие сигнала амплификации, CT=40,00 (неопределенное).
IPC	PEC	Минимум 2 из 3 реакций должны показать сигнал амплификации CT < 40,00.
IPC	Тестируемый образец	Минимум 2 из 3 реакций должны показать отсутствие сигнала амплификации, CT=40,00 (неопределенное).

Таблица 44. Предоставление и интерпретация данных

Тестируемый образец (GC BPV-3/гxn)	Предоставление	Интерпретация
Значение CT BPV-3 является неопределенным (CT=40,00), что указывает на отсутствие BPV-3, или среднее значение GC/гxn BPV-3 равняется или меньше LOD95% анализа (27 GC/гxn)	BPV-3 не обнаружен	Последовательность-мишень не обнаружена или обнаружена на уровне ниже LOD95% анализа.
Среднее значение GC/гxn BPV-3 меньше LOQ анализа (1E3) и больше LOD95% анализа (27 GC/гxn)	BPV-3 обнаружен (количество представлено как Log10 среднего значения \pm стандартное отклонение на мл)	Последовательность-мишень обнаружена, но на уровне ниже LOQ анализа; не поддается точному количественному определению.
Среднее значение GC/гxn BPV-3 находится в пределах динамического диапазона анализа (от 1E3	BPV-3 обнаружен (количество представлено как Log10 среднего значения \pm стандартное	Последовательность-мишень обнаружена, а количественное определение является точным и

до 1Е8 GC/гxn)	отклонение на мл)	находится в пределах линейного диапазона анализа.
Среднее значение GC/гxn для BPV-3 превышает верхнюю установленную точку (1Е8) динамического диапазона анализа	BPV-3 обнаружен (количество представлено как Log10 среднего значения \pm стандартное отклонение на мл) В качестве альтернативы количество может быть представлено как превышающее верхний предел динамического диапазона анализа.	Последовательность-мишень обнаружена в количестве, превышающем верхнее значение динамического диапазона анализа. Анализ можно повторять с различными коэффициентами разведения, чтобы обеспечить возможность количественного определения в пределах рабочего диапазона.

Результаты исследования верификации

В таблицах 45, 47 и 49 представлены результаты определения пригодности системы анализа и аналитических контролей для трех независимых экспериментов. Все три независимых эксперимента/прогона удовлетворяли установленным критериям пригодности системы и приемлемости аналитических контролей, определенным в данном документе. В таблицах 45, 47 и 49 представлены результаты для тестируемых образцов (образец А: ранее подтвержденный положительный образец, и образец В: ранее подтвержденный отрицательный образец). Результаты исследования верификации демонстрировали, что BPV-3 не обнаруживался в отрицательном образце (образец В) во всех трех независимых экспериментах/прогонах, а BPV-3 мог быть обнаружен и количественно определен в положительном образце (образце А) во всех трех независимых экспериментах/прогонах.

Таблица 45. Верификационный прогон № 1 соответствовал критериям приемлемости для пригодности системы анализа и аналитических контролей.

Мишень	Контроль	СТ	Количество GC/гxn	Среднее значение количества (GC/гxn)	Стандартное отклонение количества	Критерии приемлемости
PP BPV-3 v3	PC_2E7	14,31	18,326,098	18,401,424	67,871	Удовлетворяют ся
		14,30	18,420,354			

		14,29	18,457,820			
	PC_2E5	21,49	168,383	167,435	3,214	Удовлетворяют ся
		21,53	163,853			
		21,47	170,069			
	PC_2E4	24,77	19,824	19,485	359	Удовлетворяют ся
		24,79	19,521			
		24,82	19,109			
	Образец B +S	24,97	17,393	17,452	53	Удовлетворяют ся
		24,96	17,468			
		24,96	17,495			
	Образец A +S	20,99	232,852	225,642	6,254	N/A
		21,07	221,700			
		21,06	222,372			
	PEC	27,67	2,981	2,935	124	Удовлетворяют ся
		27,65	3,029			
		27,77	2,794			
	NEC	40,00	0	0	0	Удовлетворяют ся
		40,00	0	0	0	
		40,00	0	0	0	
	NTC	40,00	0	0	0	Удовлетворяют ся
		40,00	0	0	0	
		40,00	0	0	0	
PP IPC v2	Образец B	40,00	N/A			Удовлетворяют ся
		40,00				
		40,00				
	Образец A	40,00				Удовлетворяют ся
		40,00				
		40,00				
	PEC	27,40				Удовлетворяют ся
		27,35				
		27,42				
	NEC	40,00				Удовлетворяют ся
		40,00				
		40,00				

PP ВРV-3 v3	Стандарт	Коэффициент корреляции (R^2): 1,000 Эффективность ПЦР-амплификации: 92,08%	Удовлетворяются
-------------	----------	---	-----------------

Таблица 46. Результаты верификационного прогона № 1 продемонстрировали, что образец В был отрицательным в отношении ВРV-3, а образец А был положительным в отношении ВРV-3, и его количество находится в пределах динамического диапазона анализа

Мишень	Тестируемый образец	СТ	Количество GC/рхп	Среднее значение количества (GC/рхп)	Стандартное отклонение количества	ВРV-3 обнаружен?	Количество Log ₁₀ GC/мл (Среднее значение ± стандартное отклонение)
PP ВРV-3 v3	Образец В	40,00	0	0	0	Нет	N/A
		40,00	0				
		40,00	0				
	Образец А	21,21	202,610	206,757	3,828	Да	7,01 ± 0,01
		21,15	210,154				
		21,17	207,507				

ВРV-3 обнаруживался в образце А в концентрации Log₁₀ 7,01 ± 0,01 геномных копий/мл (среднее значение ± стандартное отклонение). ВРV-3 не обнаруживался в образце В.

Таблица 47. Верификационный прогон № 2 соответствовал критериям приемлемости для пригодности системы анализа и аналитических контролей

Мишень	Контроль	СТ	Количество GC/рхп	Среднее значение количества (GC/рхп)	Стандартное отклонение количества	Критерии приемлемости См. таблицу 19
PP ВРV-3 v3	PC_2E7	14,12	20,329,452	20,227,899	112,064	Удовлетворяются
		14,12	20,246,576			
		14,13	20,107,670			
	PC_2E5	21,12	214,577	208,974	11,572	Удовлетворяются
		21,26	195,666			

		21,11	216,678			
	PC_2E4	24,72	20,728	20,763	497	Удовлетворяют ся
		24,75	20,285			
		24,68	21,277			
	Образец B +S	24,86	18,896	18,752	1,277	Удовлетворяют ся
		24,78	19,951			
		24,99	17,409			
	Образец A +S	21,13	214,134	213,831	263	N/A
		21,13	213,692			
		21,13	213,667			
	PEC	27,67	3,044	2,874	148	Удовлетворяют ся
		27,81	2,777			
		27,80	2,799			
	NEC	40,00	0	0	0	Удовлетворяют ся
		40,00	0	0	0	
		40,00	0	0	0	
	NTC	40,00	0	0	0	Удовлетворяют ся
		40,00	0	0	0	
		40,00	0	0	0	
PP IPC v2	Образец B	40,00	N/A			Удовлетворяют ся
		40,00				
		40,00				
	Образец A	40,00				Удовлетворяют ся
		40,00				
		40,00				
	PEC	27,52				Удовлетворяют ся
		27,66				
		27,57				
	NEC	40,00				Удовлетворяют ся
		40,00				
		40,00				
PP BPV- 3 v3	Стандарт	Коэффициент корреляции (R^2): 1,000 Эффективность ПЦР-амплификации: 91,50%			Удовлетворяют ся	

Таблица 48. Результаты верификационного прогона № 2 продемонстрировали, что

образец В был отрицательным в отношении ВРV-3, а образец А был положительным в отношении ВРV-3, и его количество находится в пределах динамического диапазона анализа

Мишень	Тестируемый образец	СТ	Количество GC/rxn	Среднее значение количества (GC/rxn)	Стандартное отклонение количества	ВРV-3 обнаружен?	Количество Log ₁₀ GC/мл (среднее значение ± стандартное отклонение)
РР ВРV-3 v3	Образец В	40,00	0	0	0	Нет	N/A
		40,00	0				
		40,00	0				
	Образец А	21,15	210,494	218,073	6,591	Да	7,04 ± 0,01
		21,07	222,461				
		21,08	221,264				

ВРV-3 обнаруживался в образце А в концентрации Log₁₀ 7,04 ± 0,01 геномных копий/мл (среднее значение ± стандартное отклонение). ВРV-3 не обнаруживался в образце В.

Таблица 49. Верификационный прогон № 3 соответствовал критериям приемлемости для пригодности системы анализа и аналитических контролей.

Мишень	Контроль	СТ	Количество GC/rxn	Среднее значение количества (GC/rxn)	Стандартное отклонение количества	Критерии приемлемости См. таблицу 19
РР ВРV-3 v3	РС_2Е7	13,92	23,374,386	24,090,493	835,483	Удовлетворяются
		13,82	25,008,390			
		13,89	23,888,704			
	РС_2Е5	21,05	223,478	226,814	5,914	Удовлетворяются
		21,05	223,321			
		20,98	233,642			
	РС_2Е4	24,79	19,401	19,309	213	Удовлетворяются
		24,82	19,065			
		24,79	19,459			
	Образец	24,69	20,650	20,570	213	Удовлетворяют

	B +S	24,69	20,732			ся
		24,72	20,329			
	Образец A +S	21,12	212,975	211,790	2,873	N/A
		21,15	208,515			
		21,11	213,881			
	PEC	27,46	3,390	3,292	140	Удовлетворяют ся
		27,48	3,355			
		27,58	3,132			
	NEC	40,00	0	0	0	Удовлетворяют ся
		40,00	0	0	0	
		40,00	0	0	0	
	NTC	40,00	0	0	0	Удовлетворяют ся
		40,00	0	0	0	
		40,00	0	0	0	
	PP IPC v2	Образец B	40,00	N/A		
40,00						
40,00						
Образец A		40,00	Удовлетворяют ся			
		40,00				
		40,00				
PEC		27,51	Удовлетворяют ся			
		27,52				
		27,57				
NEC		40,00	Удовлетворяют ся			
		40,00				
		40,00				
PP BPV- 3 v3	Стандарт	Коэффициент корреляции (R^2): 1,000 Эффективность ПЦР-амплификации: 92,114			Удовлетворяют ся	

Таблица 50. Результаты верификационного прогона № 3 продемонстрировали, что образец В является отрицательным в отношении BPV-3, а образец А является положительным в отношении BPV-3, и его количество находится в пределах динамического диапазона анализа

Мишень	Тестируемый образец	СТ	Количество GC/txn	Среднее значение количества (GC/txn)	Стандартное отклонение количества	BPV-3 обнаружен?	Количество Log ₁₀ GC/мл (Среднее значение ± стандартное отклонение)
PP BPV-3 v3	Образец В	40,00	0	0	0	Нет	N/A
		40,00	0				
		40,00	0				
	Образец А	21,09	217,541	220,903	4,909	Да	7,04 ± 0,01
		21,03	226,536				
		21,08	218,632				

BPV-3 обнаруживается в образце А в концентрации Log₁₀ 7,04 ± 0,01 геномных копий/мл (среднее значение ± стандартное отклонение). BPV-3 не обнаруживается в образце В.

В таблице 51 представлены установленные квалификационные критерии анализа BPV-3. Квалифицированный количественный анализ BPV-3 обеспечивает возможность количественного определения от 1Е3 до 1Е8 геномных копий BPV-3 в одной ПЦР-реакции.

Параметр	Квалификационные критерии
Динамический диапазон	от 1Е3 до 1Е8 GC/txn
Нижний предел количественного определения	1Е3 GC/txn
Верхний предел количественного определения	1Е8 GC/txn
Предел обнаружения (LOD95%)	27 GC/txn с 95% доверительным интервалом от 22 до 34 GC/txn

Таблица 51. Квалификационные критерии анализа BPV-3

Тестируемые образцы А и В удовлетворяли требованиям квалификационных характеристик для количественного анализа, включая специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, прецизионность, точность и робастность.

Все тестируемые образцы (образцы А и В) удовлетворяли предложенным критериям пригодности системы и приемлемости анализа. Уровень количественного определения между тремя независимыми прогонами показал сходные результаты (таблицы 45, 47 и 49), что указывает на точность, прецизионность и робастность в качестве характеристик квалифицированного анализа. Количественный анализ ВРV-3 и соответствующие квалификационные данные продемонстрировали, что количественный анализ ВРV-3 методом ПЦР в режиме реального времени обеспечивал обнаружение и количественное определение ДНК ВРV-3 в тестируемом образце.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая олигонуклеотиды, выбранные из групп, состоящих из:
 - a) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;
 - b) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6;
 - c) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9;
 - d) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12;
 - e) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15;
 - f) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22;
 - g) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и
 - h) олигонуклеотидов, имеющих последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.
2. Композиция по п. 1, где композиция необязательно содержит вторую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.
3. Композиция по п. 1, где композиция содержит олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.
4. Композиция по п. 1, где композиция содержит первую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и вторую композицию, содержащую олигонуклеотиды, имеющие последовательность под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.
5. Реагент для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, выбранный из группы, состоящей из:
 - a) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;
 - b) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6;
 - c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9;
 - d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12;

е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15;

ф) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22;

г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и

h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

6. Реагент по п. 5, где SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель.

7. Реагент по п. 5, где одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и/или нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), либо гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

8. Реагент по п. 5, где комбинация праймеров и зондов обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей структурный капсидный (VP) белок и/или неструктурный (NS) белок парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в тестируемом образце.

9. Реагент по п. 5 в комбинации с комбинацией праймеров внутреннего положительного контроля.

10. Реагент по п. 5, содержащий SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

11. Реагент для применения в качестве комбинации праймеров и зондов внутреннего положительного контроля в анализе для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащий комбинацию праймеров и зондов.

12. Реагент по п. 11, где комбинация праймеров и зондов имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

13. Реагент по п. 11, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель.

14. Реагент по п. 13, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

15. Комбинация праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3).

16. Комбинация праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа по п. 15, где комбинация праймеров и зондов выбрана из

групп, состоящих из:

- a) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;
- b) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6;
- c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9;
- d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12;
- e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15;
- f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22;
- g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и
- h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

17. Комбинация праймеров и зондов по п. 16, где SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 имеют флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель.

18. Комбинация праймеров и зондов по п. 16, где одна или несколько из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28 имеют флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и/или нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), либо гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ) на 3'-конце.

19. Комбинация праймеров и зондов по п. 15, где комбинация праймеров и зондов обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей структурный капсидный (VP) белок и/или неструктурный (NS) белок парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, в тестируемом образце.

20. Комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в тестируемом образце по п. 15, где комбинация праймеров и зондов имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

21. Комбинация праймеров и зондов внутреннего положительного контроля по п. 20, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель.

22. Комбинация праймеров и зондов по п. 20, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-

карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

23. Комбинация праймеров и зондов для обнаружения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащая SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, в комбинации с комбинацией праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, содержащей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце, а SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

24. Набор для обнаружения загрязнения геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа (BPV-3) в экстрагированной ДНК тестируемого образца, содержащий

комбинацию праймеров и зондов, которая обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей BPV-3, выбранную из группы, состоящей из:

a) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;

b) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6;

c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9;

d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12;

e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15;

f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22;

g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25; и

h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28; и

необязательно комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

25. Способ определения наличия или отсутствия геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в экстрагированной ДНК тестируемого образца, предусматривающий:

1) реакционную смесь, содержащую тестируемый образец, положительный

контроль, плазмидную ДНК положительного контроля BPV-3_IPC, реагенты для амплификации нуклеиновых кислот, комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце, и комбинацию праймеров и зондов, селективную в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, выбранную из группы, состоящей из:

a) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

b) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

c) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

d) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

e) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, где SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

f) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, где SEQ ID NO: 22 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

g) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, где SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; и

h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, где SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

2) осуществление в отношении реакционной смеси методики количественной ПЦР

с получением копий последовательности-мишени,

3) измерение любого увеличения сигнала флуоресценции,

где увеличение сигнала флуоресценции указывает на присутствие геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в тестируемом образце.

26. Способ по п. 25, где флуоресцентный репортерный краситель представляет собой 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), а нефлуоресцентный гаситель представляет собой нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), или гаситель флуоресценции ZEN-IB и Iowa Black (IBFQ).

27. Способ по п. 25, дополнительно предусматривающий один или несколько отрицательных контролей экстракции, контролей без матрицы, положительных контролей экстракции, положительных контролей и/или контролей ингибирования.

28. Способ по п. 25, где чувствительность или аналитический предел обнаружения составляет 22 геномные копии на реакцию.

29. Способ по п. 25, где предел обнаружения образца составляет 25 геномных копий на реакцию.

30. Способ по п. 25, где комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, обеспечивает обнаружение ДНК, кодирующей неструктурный (NS) белок и/или структурный капсидный (VP) белок парвовируса крупного рогатого скота 3 типа.

31. Способ по п. 25, где комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, обеспечивает амплификацию фрагмента размером 144 п. о.

32. Способ по п. 25, где комбинация праймеров и зондов, селективная в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, содержит комбинацию SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и средство, связывающееся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

33. Способ по п. 25, дополнительно предусматривающий комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля.

34. Способ по п. 33, где комбинация праймеров и зондов имеет последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

35. Способ по п. 34, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель и/или нефлуоресцентный гаситель.

36. Способ по п. 34, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель 2'-хлор-7'-фенил-1,4-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (VIC) на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель, связывающийся с малой бороздкой (MGB-NFQ), на 3'-конце.

37. Способ количественного определения от $1E3$ до $1E8$ геномных копий геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа в ПЦР-реакции, предусматривающий:

1) реакционную смесь, содержащую экстрагированную ДНК тестируемого образца, положительный контроль, плазмидную ДНК положительного контроля BPV-3_IPC,

реагенты для амплификации нуклеиновых кислот, комбинацию праймеров и зондов внутреннего положительного контроля, имеющую последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, где SEQ ID NO: 18 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце, и комбинацию праймеров и зондов, селективную в отношении последовательности ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа, выбранную из группы, состоящей из:

а) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где SEQ ID NO: 3 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

б) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

с) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, где SEQ ID NO: 9 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

д) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

е) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, где SEQ ID NO: 15 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; ф) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, где SEQ ID NO: 22 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

г) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, где SEQ ID NO: 25 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце; и

h) комбинации праймеров и зондов, имеющей последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, где SEQ ID NO: 28 имеет флуоресцентный репортерный краситель на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель на 3'-конце;

2) осуществление в отношении реакционной смеси методики количественной ПЦР с получением копий последовательности-мишени и

3) измерение любого увеличения сигнала флуоресценции.

38. Способ по п. 37, где предел обнаружения (LOD95%) способа составляет 27 геномных копий геномной ДНК парвовируса крупного рогатого скота 3 типа на реакцию с 95% доверительным интервалом от 22 до 34 геномных копий на реакцию.

39. Способ по п. 37, где линейность способа характеризуется коэффициентом корреляции (R^2) 0,98 или больше и эффективностью ПЦР-амплификации в пределах 90-110%.

40. Способ по п. 37, где способ характеризуется величиной сходимости, которая представляет собой % CV количества, который равняется или меньше 25%.

41. Способ по п. 37, где способ характеризуется величиной промежуточной прецизионности, которая представляет собой % CV количества, который равняется или меньше 30%.

42. Способ по п. 37, где способ характеризуется величиной точности в пределах $\pm 30\%$ от принятого эталонного значения (ST) во всем динамическом диапазоне анализа.

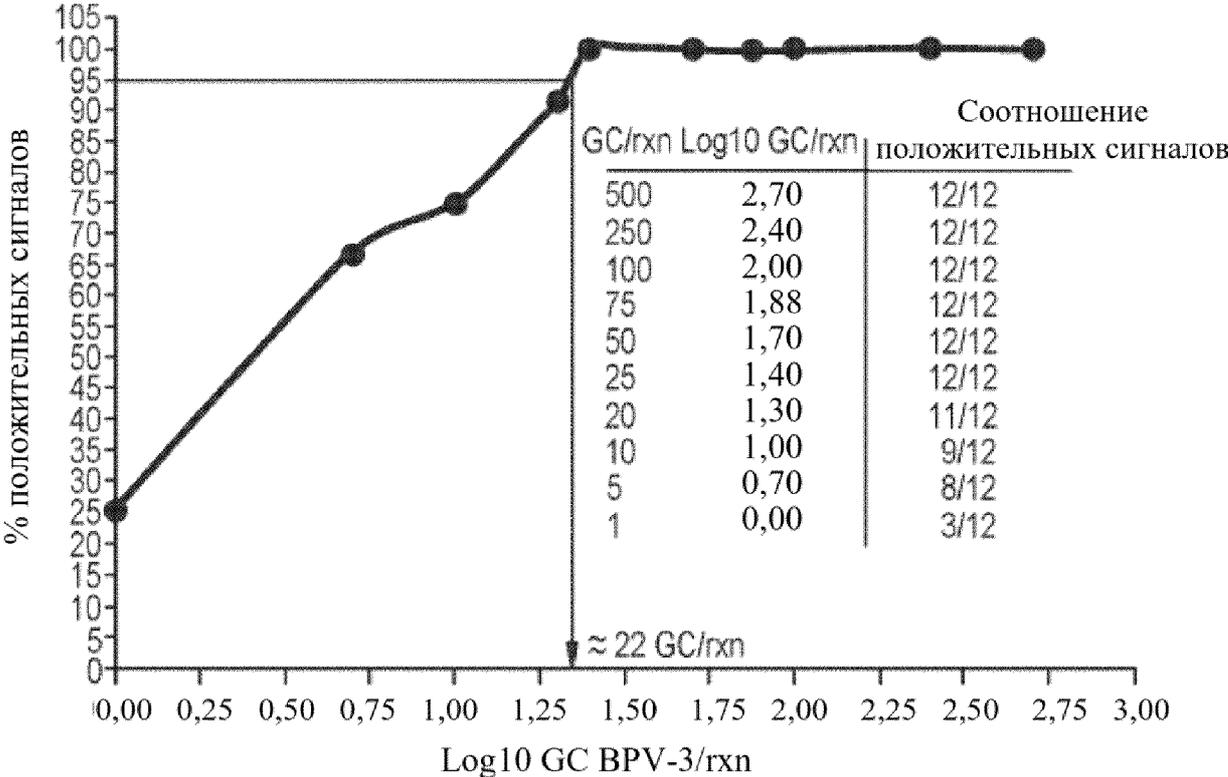
43. Способ по п. 37, где способ характеризуется пределом количественного определения, который представляет собой % CV количества для сходимости при 25% или меньше, промежуточной прецизионности при 30% или меньше и критерия приемлемости для точности в пределах $\pm 30\%$ от ожидаемого стандартного эталонного значения.

44. Способ по п. 37, где способ характеризуется робастностью с процентным CV количества для сходимости 25% или меньше, промежуточной прецизионности 30% или меньше и точности среднего значения количества для тестируемого условия с комбинированной матрицей $\pm 30\%$ от среднего значения количества для оптимизированного условия.

45. Способ по п. 37, где способ предусматривает одно или несколько из контроля без матрицы, положительного контроля, отрицательного контроля экстракции, положительного контроля экстракции, контроля ингибирования, внутреннего положительного контроля и стандарта.

По доверенности

ФИГ. 1



ФИГ. 2

