



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» для выявления ДНК *Yersinia enterocolitica* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

ТУ 21.10.60-361-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

1. Назначение	4
2. Характеристика набора	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические характеристики.....	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование	6
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	8
6.2 Подготовка исследуемых проб	8
7. Проведение анализа	9
7.1 Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб	9
7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР	9
7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией	10
8. Интерпретация результатов анализа	10
9. Условия транспортирования	12
10. Условия хранения	12
11. Срок годности	12
Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)	13
Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	18
Анализ результатов амплификации	19
Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)	20
Приложение 4. Порядок работы на приборе LightCycler® 96	23
Приложение 5. Лист вносимых изменений	31

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР РВ	полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК *Yersinia enterocolitica* в биологическом материале (смывы из прямой кишки, фрагменты паренхиматозных органов, лимфоузлы, фекалии) и продуктах животного происхождения (молочные продукты, мясо и мясные продукты, птицеводческая продукция), а также в культурах микроорганизмов, смывах с поверхностей методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома *Yersinia enterocolitica* и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы);
- 2) Для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Протокол выходного контроля доступен по запросу.

Таблица 1. Комплект №1 для проведения ПЦР:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР СМЕСЬ YERSINIA	прозрачная бесцветная жидкость*	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР YERSINIA	прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
3	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	60	1
4	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	Прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1

Таблица 2. Комплект №2 контрольные образцы:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО Т1	Прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)²	Прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО YERSINIA	Прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные

* Возможна легкая опалесценция

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других микроорганизмов: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganana*, *Enterococcus faecalis* spp.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК свиньи, КРС, кошки, собаки и человека.

4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Tarsons», Индия);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Tarsons», Индия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Axygen», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология; «CFX96», Biorad).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
- Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Axygen», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение

Для исследования используют следующий материал:

- Ректальный смыв берется с использованием стерильных зондов с ватными тампонами и стерильных пробирок объемом типа Эппендор на 1,5 мл, содержащие 300-500 мкл стерильного физиологического раствора
- Фекалии весом 5 г отбирают в стерильный пластиковый контейнер
- Фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.) отбирают в стерильный контейнер.
- Лимфоузлы берут на исследование целиком.
- Продукты животного происхождения отбирают в стерильные контейнеры.
- Культуры микроорганизмов в жидких средах отбирают в стерильную тару;
- Бактериальные колонии ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора;
- Питательные среды отбирают в стерильную тару (твердые ресуспендируют в физиологическом растворе);
- Смывы с поверхностей (внутрилабораторных, с поверхностей тары, кормушек, мест содержания животных и др.) отбирают в стерильную тару с 0,5 мл физиологического раствора.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8°C – в течение суток;
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемых проб

Ректальный смыв, культуры микроорганизмов и питательные среды, смывы с поверхностей используют для выделения ДНК без предварительной подготовки. Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Из фекалий (1-5 г) готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Взвесь фекалий декантируют в течении 5-10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5 мин. Экстракцию НК из осветленного экстракта фекалий проводят по возможности, сразу. При необходимости хранения замораживают.

Исследуемые пробы тканей, органов и продуктов свиного происхождения (небольшие кусочки до 1 г весом) гомогенизируют с использованием

стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов. Затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию центрифугируют при 2 тыс. об./мин в течение 5-10 минут. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции ДНК.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК;
- проведение реакции ПЦР РВ;
- учет результатов анализа.

7.1 Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО³ (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО YERSINIA, ВКО Т1** и ДНК буфера.

Примечание. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше 40°C (с использованием термостата). **Прогревание пробирки TAQ POLYMERASE категорически запрещено.**

В отдельной пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию:

³ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

5 мкл ПЦР СМЕСЬ YERSINIA
10 мкл смеси ПЦР БУФЕР YERSINIA
0,5 мкл TAQ POLYMERASE

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл ДНК буфера;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО YERSINIA.

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку, **запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!**

В случае использования приборов планшетного типа («ДТ-96», «CFX96», LightCycler® 96 и прочие) необходимо стряхнуть капли со стенок пробирок (или плашек) кратким центрифугированием).

7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией

Параметры температурно-временного режима амплификации на приборах «Rotor-Gene Q», «ДТ-96», «CFX96» и LightCycler® 96 указаны в Приложениях 1, 2, 3 и 4 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Программировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 1, 2, 3 и 4 Инструкции.

В случае использования амплификаторов других моделей рекомендуется консультация со специалистом компании «ВЕТ ФАКТОР».

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

8. Интерпретация результатов анализа

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору и в соответствии с Приложениями 1, 2,3 и 4 Инструкции.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем

уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

Проба	Канал детекции		Результат
	JOE(HEX)/ Yellow	FAM/Green	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ВКО	
ПКО К+	До 31	до 31	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	Сигнал отсутствует	Любое значение	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 35	Экстракция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >35	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	Любое значение от 1 до 35	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>ДНК Yersinia enterocolitica</i> присутствует
	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 35	Результат анализа отрицательный
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >35	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- значение Ct для ВКО отсутствует или превышает граничное, а в К+ значение Ct для ВКО менее граничного (и в образцах Ct для ВКО менее граничного) – результаты можно считать достоверными. Также в случае если значение Ct для ВКО в К+ отсутствует или превышает граничное, а в ВК- и образцах менее граничного – результаты можно считать достоверными.

Если при повторной постановке наблюдается схожий результат (**Ct** на канале **JOE(HEX)/Yellow** более 35), требуется повторное взятие материала от того же животного для проведения ПЦР-исследования и (или) использование альтернативных методов диагностики. В случае получения положительного результата (значения **Ct** на канале **JOE(HEX)/Yellow** менее 35) при исследовании повторно взятого от животного материала - образец считать положительным (**ДНК *Yersinia enterocolitica* присутствует**).

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения **Ct** для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения **Ct** на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

9. Условия транспортирования

Набор «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Длительное хранение комплектов набора «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

Перед началом работы с набором компоненты набора следует разукomплектовать и хранить в соответствии со следующими требованиями:

- 1) Комплект №1 (см. Табл. 1) при температуре от минус 18 до минус 20°С;
- 2) Комплект №2 (см. Табл. 2) при температуре от 2 до 8°С.

11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

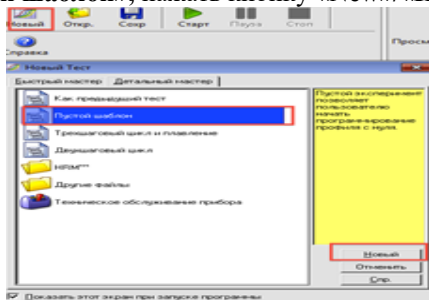
Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

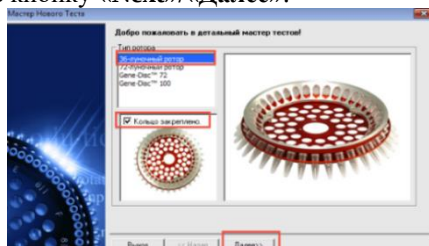
При работе с прибором Rotor-Gene 3000 используют программу Rotor-Gene версии 6 или выше, с приборами Rotor-Gene6000и Rotor-GeneQ– используют программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build67) или выше.

Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» **3000** / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**/ для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**.

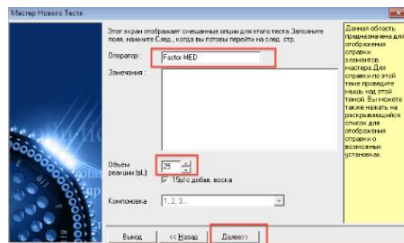
1. Открыть программу «**Rotor Gene Q**».
2. Выбрать в основном меню программы значок «**New**»/«**Новый** В открывшемся окне выбрать «**Пустой шаблон**», нажать кнопку «**New**»/«**Новый**».



3. Выбрать тип ротора. Например, «**36-Well Rotor**»/«**36-луночный ротор**» при использовании ротора на 36 образцов. Поставить отметку в окошке рядом с надписью «**No Domed 0.2 ml Tubes**»/«**Locking ring attached**»/«**Кольцо закреплено**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



4. Указать оператора, объем реакционной смеси «**Reaction volume**»/Объем реакции» – **25 мкл**. Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко «**15 µl oil layer volume**»/«**15 µL объем масла/воска**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



5. В верхней части окна нажать кнопку «**Edit profile**»/«**Редактор профиля**». В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 4. Нажать клавишу «**OK**».

Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации на Rotor-Gene

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция Yellow, Green	
	72°C – 20 сек	

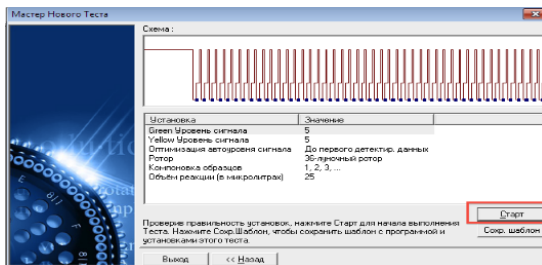
Для этого требуется проделать следующие шаги:

-Нажать клавишу «**Insert before**»/«**Вставить до**» и выбрать «**New hold at temperature**»/«**Новое удержание температуры**», установить температуру 95°C и время 5 мин в соответствии с пунктом 1 таблицы 4;

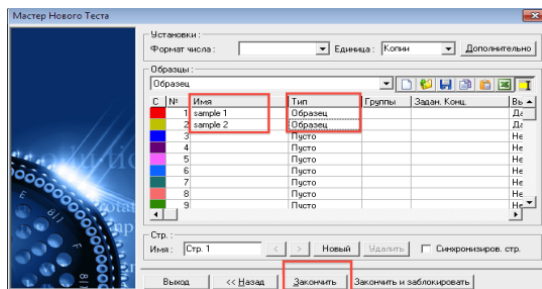
-Нажать клавишу «**Insert after**»/«**Вставить после**» и выбрать «**New cycling**»/«**Новое циклирование**», установить параметры циклирования в соответствии с пунктом 2 таблицы 4.

6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «**Calibrate/Gain Optimisation...**»/«**Опт.уровня сигн.**». В открывшемся окне нажать кнопку «**Опт.детек-мех**». Для обоих каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading** /минимальный сигнал - 5, **Max Reading** /максимальный сигнал — 10. В графе «**Позиция Пробирки**» указать номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «**усиления сигнала**», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поставить галочкой строку **Perform Calibration Before 1st Acquisition** «**Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**». Закройте окно «**Авто-оптимизация уровня сигнала**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».

7. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**». Дать название эксперимента и сохранить его на диске.



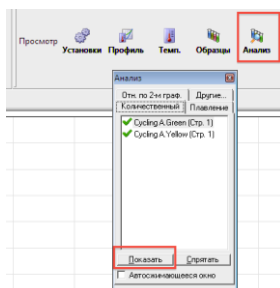
8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню Тип как Unknown «Образец».



1. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

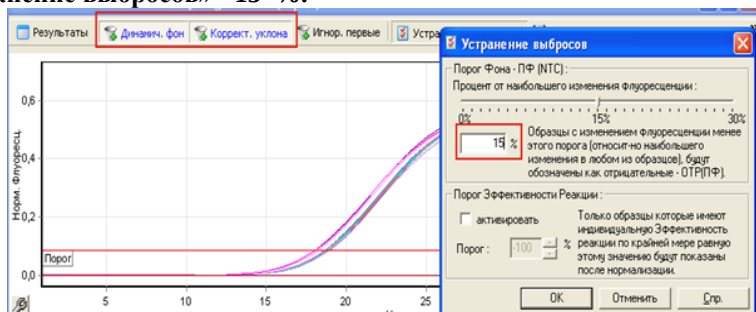
Анализ результатов амплификации для канала Green (ВКО).

10. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. Green», далее «Show»/«Показать».



11. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale**/Линейная шкала в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale**/Линейная шкала видна кнопка **Log scale**/Логарифмическая шкала).

12. В меню основного окна нажать кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и Slope Correct«**Коррект. уклона**». Установить More settings/Outlier Removal «**Устранение выбросов**» - 15¹ %.



13. В меню «**CT Calculation**»/«**Вычисление СТ**» выставить Threshold/Порог =0,05. В таблице результатов (окно «**Quant. Results**»/«**Количественные Результаты**») появятся значения СТ.

Количественный Анализ - Cycling A.Green (Page 1)

Результаты Динамич. фон Коррект. уклона Игнор. первые Устранение выбросов

Количественные Результаты - Cycling A.Green (...)

№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Расч. >
1	k+	Образец	17,07		
2	k-	Образец			
3	sample 1	Образец	19,88		
4	sample 2	Образец	19,33		
5	kv	Образец	18,98		

Анализ результатов амплификации для канала Yellow (YERSINIA).

14. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. Yellow**, далее нажать **Show/Показать**

15. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

16. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и Slope Correct«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 15² %.

¹ Если для отрицательного контроля этапа ПЦР К- на канале FAM/ Green при учете результатов по п 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените «**Устранение выбросов**» до 20% и оцените прохождение контрольных образцов повторно

17. В меню «**CT Calculation**»/«**Вычисление СТ**» выставить **Threshold/Порог** =0,05. В таблице результатов (окно «**Quant. Results**»/«**Количественные Результаты**») появятся значения **Ct**.

Учет результатов ПЦР-анализа по обоим каналам проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

² Если для отрицательных контролей этапов экстракции или ПЦР (**ВК-, К-**) на канале JOE/Yellow при учете результатов по п 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените «**Устранение выбросов**» до **20%** и оцените прохождение контрольных образцов повторно

Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

1. Открыть программу «**RealTime PCR**» для прибора ДТ-96.
2. В появившемся окне выбрать «**Работа с прибором**».
3. В верхней части окна открыть вкладку «**Тест**» и «**Создать/Редактировать тест**»:
4. Нажать на кнопку «**Создать новый тест**» и ввести имя нового теста «**ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР**»:
Нажать «**ОК**».
5. В появившемся окне задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Пороговый (Ct)

Пробирки – образцы

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – Fam; Hex

Создать программу амплификации «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» нажав на иконку .

6. В редакторе программ амплификации выбрать шаблон  и нажать кнопку «**Применить**».
7. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации на «ДТ96».

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция HEX, FAM	
	72°C – 20 сек	

Детекцию осуществлять после стадии отжиг. Нажать «**ОК**» и сохранить программу под именем «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР ». При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8. При запуске прибора выбрать «**Работа с прибором**» и «**Добавить тест**». В окне добавления теста выбрать «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР ».
9. В разделе «**1. Образцы**» ввести количество образцов включая все контрольные образцы. В разделе «**3. Контроли**» поставить нули и нажать «**ОК**».

10. Пользуясь инструкцией к прибору заполнить «**Идентификатор пробирки**» и «**Тип**», обращая внимание на порядок заполнения. Нажать кнопку «**Применить**».

11. Установить пробирки в реакционный блок согласно порядку заполнения и нажать кнопку «**Запуск программы**». В появившемся окне набрать название протокола и «**Сохранить**».

12. После завершения реакции можно сразу приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать «**Просмотр архива**».

Анализ результатов амплификации

13. Далее нажать на иконку с изображением папки  и выбрать файл, в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа «**Ct(Cp)** для **всех каналов**». Метод – «**Пороговый (Ct)**». В окне справа отобразятся названия образцов и значения пороговых циклов. Выбрать 10%. В позиции **Критерии достоверности данных** ввести: Нижняя граница/порог положительного результата-5%, верхняя граница/порог нормализации данных -30%.

14. Нажать кнопку «**Применить**».

15. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку .
16. В верхней части окна нажать клавишу «**Печать**» или «**Сохранить**», выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее «**Рабочий стол**» → «**ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР**» → «**Отчеты**» → «**Год**» → «**Месяц**», в поле «**Имя файла**» ввести название в форме «**год. месяц. число-данные**». Нажать сохранить.

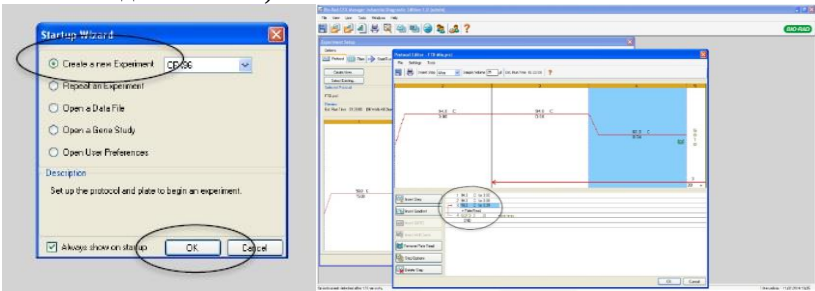
17. Нажать клавишу «**Заккрыть**».

18. Закрыть или свернуть программу «**RealTime PCR**».

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)

- 1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
- 2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).



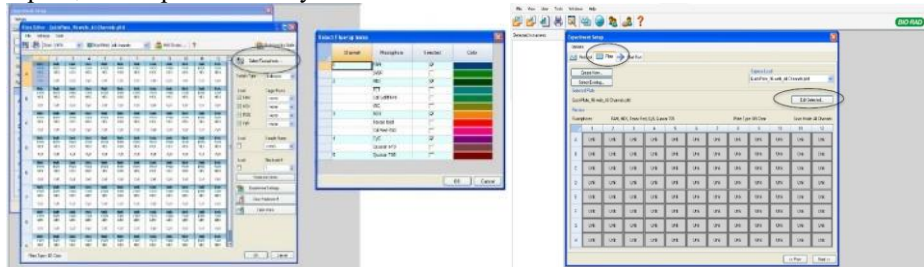
- 3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на CFX96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция HEX, FAM	
	72°C – 20 сек	

Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

- 4. Задать схему планшета – расположение пробирок и детекцию флуоресцентного сигнала во всех пробирках по используемым каналам в окне **Plate** модуля **Experiment Setup**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками флуорофоры **FAM** и **HEX** и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по данным каналам. В окне **Sample name** задать название образцов. Сохранить схему планшета.



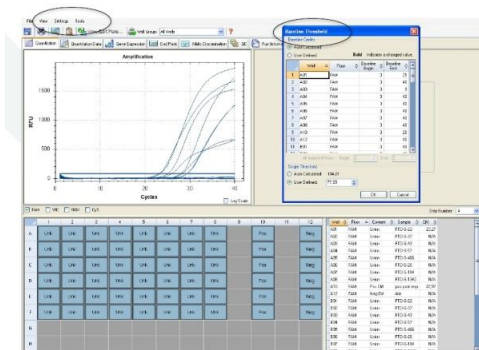
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» с заданной схемой планшета, нажав кнопку **Start Run**.

6. После окончания выполнения программы можно приступить к анализу результатов с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**.

Анализ результатов амплификации для канала FAM (BKO).

7. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **FAM**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции.



Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

9. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

Анализ результатов амплификации для канала HEX (YERSINIA).

10. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **HEX**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным

ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «K+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

11. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

12. Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 4. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

Возможны два варианта запуска программы:

- а) Создание файла эксперимента на рабочем компьютере с помощью программы *LightCycler® 96*, либо скачивание готового файла из программы *BET ФАКТОР*, далее перенесение эксперимента в прибор и запуск программы.
- б) Создание файла эксперимента непосредственно на приборе перед запуском программы (подробнее см. инструкцию производителя прибора).

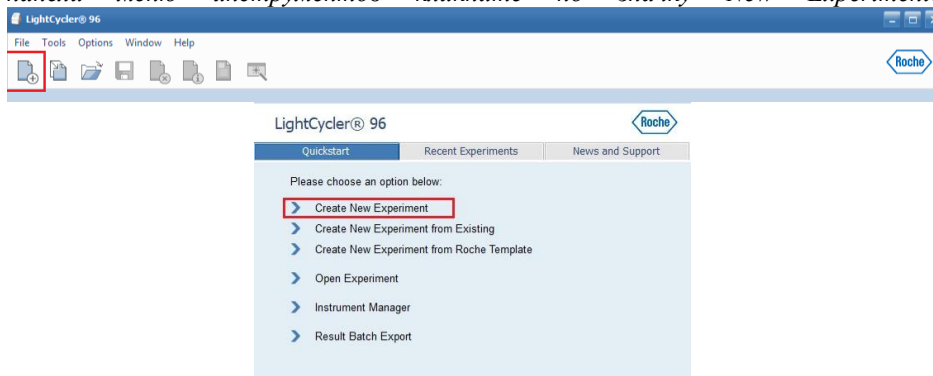
В первом случае возможно редактирование образцов до или после постановки эксперимента, во втором только после постановки эксперимента.

Первый вариант запуска программы: создание файла на рабочем столе с помощью программы *LightCycler® 96*.

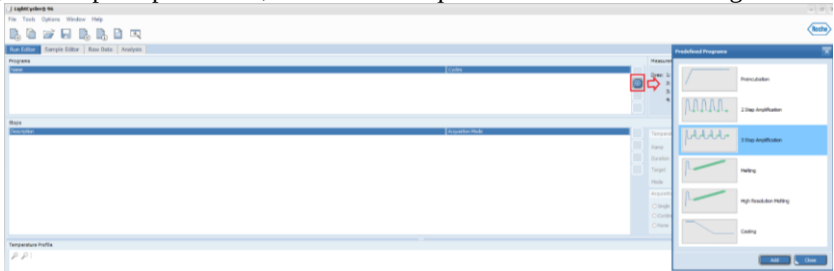
*Если установлена программа **BET ФАКТОР**, можно скачать готовый файл из программы (файл называется **Yersinia**). После скачивания откройте файл и переходите к пункту 4 (правка образцов) приложения 4 данной инструкции.*

1. Откройте рабочую программу *LightCycler® 96*, для чего дважды кликните по значку запуска программы. Дождитесь загрузки меню и открытия основного окна после инициализации.

2. Выберите пункт *Create new Experiment (создать новый эксперимент)* либо в панели меню инструментов кликните по значку *New Experiment*.



3. В открывшемся окне выберите вкладку Run Editor, в боковой части окна Programs нажмите , после чего откроется окно Predefined Programs. В данном окне выберите Preincubation, нажмите кнопку Add, после чего в левой части экране Programs появится стадия Preincubation. Аналогичным образом добавьте стадию 3 step Amplification, после чего закройте окно Predefined Programs.

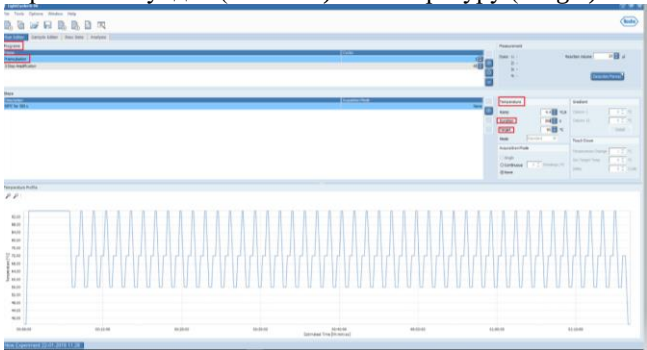


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 7.

Таблица 7. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 300 сек	1
2	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция HEX, FAM	
	72°C – 20 сек	

Для этого в левой верхней части окна в разделе Programs выберите Preincubation, далее в нижней правой части, в разделе Temperature задайте необходимое время в секундах (Duration) и температуру (Target).

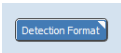


Далее в левой верхней части окна в разделе Programs выберите 3 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. В разделе Acquisition Mode на нужной стадии необходимо указать считывание сигнала (single).



В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

В окне Reaction Volume, в разделе Measurement (в правой части окна) укажите объем реакции равный 25 мкл.

Под Reaction Volume нажмите вкладку  и отметьте флуорофоры Fam и Hex

Selected	Dye	Quant Factor	Host Factor
☐	SYBR Green I	20.00	1.20
☐	ResoLight	20.00	1.20
☒	FAM	10.00	1.20

Selected	Dye	Quant Factor	Host Factor
☐	VIC	10.00	1.20
☒	Hex	10.00	1.20
☐	Yellow555	10.00	1.20

Selected	Dye	Quant Factor	Host Factor
☐	RxRed ID	10.00	1.20
☐	Texas Red	10.00	1.20

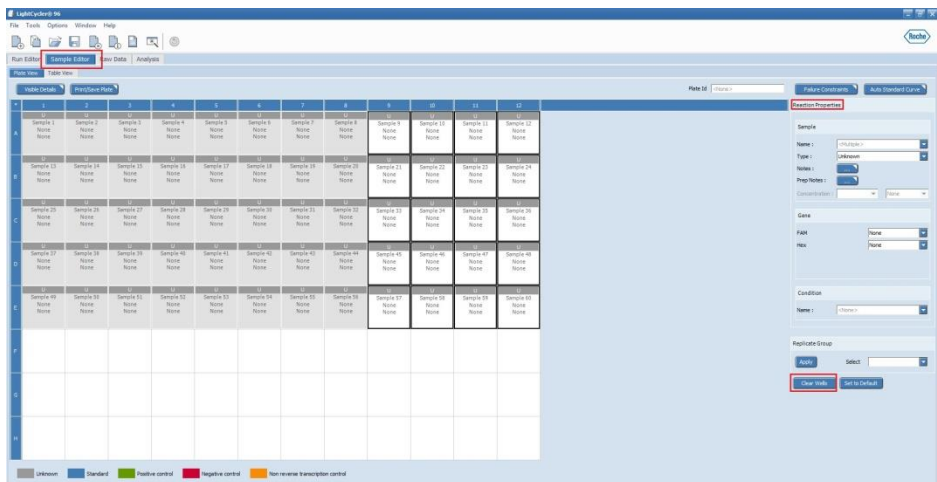
Selected	Dye	Quant Factor	Host Factor
☐	Cy5	10.00	1.20

Integration Time
☐ Dynamic ☐ Manual

OK Cancel

4. Перейдите на вкладку Sample Editor⁶ (правка образцов). Пустые лунки следует удалить, оставив только значимые данные, для чего выделите пустые ячейки с помощью левой кнопки мыши и нажмите кнопку  в правой нижней части раздела Clear wells:

⁶ Образцы можно редактировать до или после поставки эксперимента: программа будет снимать данные флуоресценции по всем выбранным каналам детекции со всех 96 лунок по умолчанию.



В окне Gene задайте наименования мишеней: FAM – vko, Hex – Yersinia enterocolitica.

В правой части, в разделе Reaction properties отредактируйте образцы: задайте названия и установите тип исследуемых образцов (Type Positive control для положительных образцов, Type Negative control для отрицательных контрольных образцов, Type Unknown для исследуемых образцов и ВК- (ОКО)).

5. В панели инструментов кликните по значку *Save Experiment*, чтобы сохранить новый эксперимент.



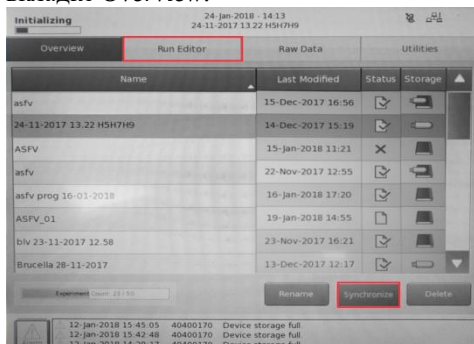
После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler® 96 (.lc96)

6. Эксперимент необходимо перенести в прибор: если прибор подключен через сетевой кабель (либо через WiFi) к компьютеру, то можно загрузить эксперимент через открытую рабочую программу LightCycler96, либо, если прибор автономен, можно воспользоваться USB носителем.

6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя

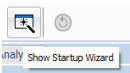
Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB  появится на панели состояния программы прибора

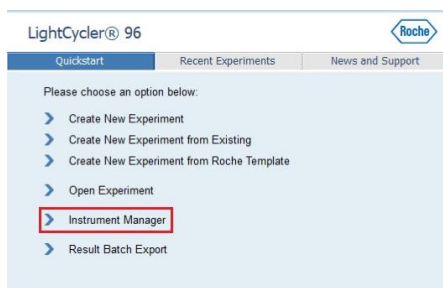
LightCycler® 96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке *Overview*.



Файлы, сохраненные на USB носителе, обозначены значком . Файлы, сохраненные на приборе, обозначены значком , файлы, которые хранятся и на приборе и на USB носителе, обозначены двойным значком. Для того чтобы перенести файл на прибор (и наоборот), необходимо нажать Synchronize. Постановку эксперимента можно проводить напрямую с USB носителя, после ее успешного завершения данные будут автоматически сохранены на USB носителе.

6.2. Перенос эксперимента в прибор с помощью рабочей программы LightCycler® 96

После сохранения эксперимента нажмите *Show Startup Wizard* . В появившемся окне выберите *Instrument Manager*:



В поле Instrument должен отобразиться прибор *LightCycler*. Затем перейдите на вкладку *Send/Receive Experiment* и в окне *You PC* выберите сохраненный эксперимент и нажмите . Эксперимент будет скопирован в

память прибора. Дальнейший запуск программы необходимо производить с помощью сенсорной панели на самом приборе LightCycler® 96.

7. Запуск эксперимента

Эксперимент запускается с помощью сенсорного управления на передней части прибора.

Загрузите плашку либо пробирки с образцами в прибор LightCycler® 96. Нажмите Start на боковой панели общих команд основного окна программы прибора LightCycler®.

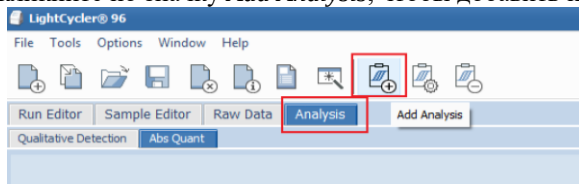


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

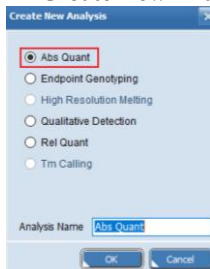
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

9. Анализ и интерпретация результатов

Откройте файл завершенного анализируемого эксперимента (со значком ) в рабочей программе LightCycler® 96. Откройте вкладку *Analysis*. На панели инструментов кликните по значку *Add Analysis*, чтобы добавить новый анализ.

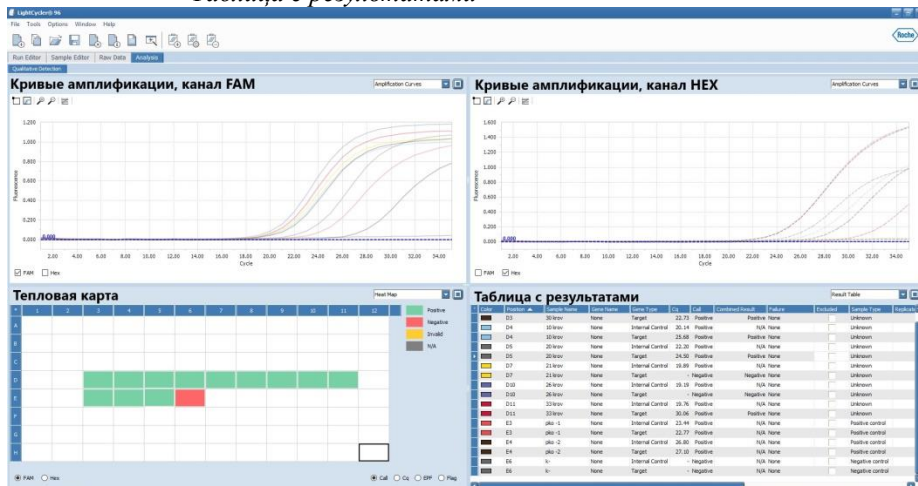


Откроется диалоговое окно *Create New Analysis*. Выберите *Abs Quant*



Нажмите *OK*. Во вкладке *Analysis* в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента:

- Кривые амплификации
- Стандартные кривые⁷
- Тепловая карта
- Таблица с результатами



На тепловой карте (левое нижнее окно на рисунке) зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.

Внимание! Необходимо визуально оценить кривые амплификации как в сыром виде (вкладка Raw Data), так и после анализа (вкладка Analysis). Кривые должны иметь классическую s-образную форму. Образцы, форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается корректный результат необходимо исключить и считать отрицательными

Для образцов форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается некорректный или отрицательный результат необходимо провести повторный анализ с этапа экстракции.



⁷ окно Стандартные кривые не будет содержать никаких данных, поскольку в наборах не предусмотрен вариант количественного анализа

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 5. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 25.05.2021	стр. 5, стр. 9	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.2 от 12.11.2021	По тексту	Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды. Изменения по тексту
Версия 1.3 от 10.01.2022	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.4 от 21.02.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке
Версия 1.5 от 27.04.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала
Версия 1.6 от 28.09.2022	Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Ст)

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-ИЕРСИНИОЗ-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru