



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-ФАКТОР» для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

ТУ 21.10.60-318-51062356-2022
Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические и диагностические характеристики	6
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы и оборудование.....	7
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб.....	8
6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение	8
6.2 Подготовка исследуемого материала	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).....	17
Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)	20
Приложение 4. Порядок работы на приборе LightCycler® 96	23
Приложение 4. Лист вносимых изменений	30

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
BLV	Bovine leukosis virus

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) в биологическом материале (цельная кровь), а также в продуктах питания (фарш, колбаса и т.п.), 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 вируса лейкоза КРС 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 РВ (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- Для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы).
- 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 BLV	прозрачная бесцветная жидкость*	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР BLV	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 T2	прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)¹	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО BLV	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 колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

* Возможна легкая опалесценция

¹ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

3. Аналитические и диагностические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении НК других микроорганизмов: вируса гриппа А, возбудителя болезни Ауески, вируса диареи КРС, вируса инфекционного ринотрахеита КРС, вируса парагриппа-3 КРС, коронавируса КРС, *Brucella abortus*; *Brucella ovis*; *Brucella canis*; *Pasteurella multocida*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium avium*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter fetus*; *Clostridium perfringens*; *Salmonella dublin*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК КРС, курицы, свиньи, 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» и с требованиями Приказа №156 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 24.03.2021 г. «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов лейкоза крупного рогатого скота».

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 рабочие реагенты и расходные материалы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одной зоны в другую.

Процесс исследования является строго односторонним, работу следует начинать в зоне подготовки материала, продолжать в зоне экстракции нуклеиновых кислот, затем в зоне амплификации. Запрещается возвращать образцы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

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

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывать 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, «Ахуген», 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 или аналогичный).
- 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, «Ахуген», США).
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», 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, «Ахуген», 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

1. Для исследования используют цельную кровь. Исследования проводят для взрослых особей и телят старше 14-ти дневного возраста. Кровь отбирают из яремной или хвостовой вены в стерильные пробирки с 3 % раствором ЭДТА из расчета 10:1. Желательно использовать одноразовые системы взятия крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают

2. Культуры микроорганизмов в жидких средах отбирают в стерильную тару.

3. Бактериальные колонии ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора.

4. Питательные среды отбирают в стерильную тару (твердые ресуспендируют в физиологическом растворе).

5. Смывы с поверхностей (внутрилабораторных, с поверхностей тары, кормушек, мест содержания животных и др.) отбирают в стерильную тару с 0,5 мл физиологического раствора.

6. Продукты питания отбирают в стерильные одноразовые контейнеры.

Полученные образцы необходимо транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение суток с момента взятия материала
- при температуре не выше минус 20°С – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание клинических образцов.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемого материала

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, 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. Для экстракции НК из цельной крови берут пробу объемом не более 50 мкл.

Пробы продуктов и сырья животного происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем обычно

готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2 тыс. об./мин в течение 2 минут. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК. В некоторых случаях образовавшуюся суспензию не центрифугируют, а отстаивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирки на 1,5 мл, и в количестве 0,1 мл используют для выделения НК.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

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

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

7.1 Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Для экстракции ДНК из исследуемого биоматериала рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» (или аналогичный).

Для экстракции ДНК из продуктов питания рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» (или аналогичный).

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 Т2**. Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения (ВК-) вместо исследуемой пробы внести **ОКО² (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять НК 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 BLV, ВКО Т2 и ДНК буфера**.

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

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 ПЦР:

5 мкл ПЦР СМЕСЬ BLV;

10 мкл смеси ПЦР БУФЕР BLV;

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 с положительным контролем ПЦР (**К+**) 10 мкл **ПКО BLV**.

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку (например, ДТ-96), 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» и LightCycler® 96 указаны в Приложениях 1, 2 и 3 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 1, 2 и 3 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 и 3 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>BLV</i>	<i>BKO</i>	
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 32	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 >32	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	Любое значение от 1 до 32	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>ДНК провируса лейкоза КРС присутствует</i>
	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 32	Результат анализа отрицательный
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >32	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 для исследуемого образца по каналу **JOE(HEX)/Yellow** значение **Ct** определяется позднее **32** цикла при корректном прохождении положительных и отрицательных контролей – он считается спорным и исследуется повторно с этапа выделения НК. Если при повторной постановке наблюдается схожий результат (**Ct** на канале **JOE(HEX)/Yellow** более **32**), требуется повторное взятие материала от того же животного для проведения ПЦР-исследования и (или) использование альтернативных методов диагностики. В случае получения значения **Ct** на канале **JOE(HEX)/Yellow** менее **32** при исследовании повторно взятого от животного материала - образец считать положительным.

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.

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

9. Условия хранения

Длительное хранение комплектов набора «**ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-ФАКТОР**» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°C.

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

Комплект №1 (см. Табл. 1) при температуре от минус 18 до минус 20°C;

Комплект №2 (см. Табл. 2) при температуре от 2 до 8°C.

10. Срок годности

Срок годности реагентов «**ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-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)

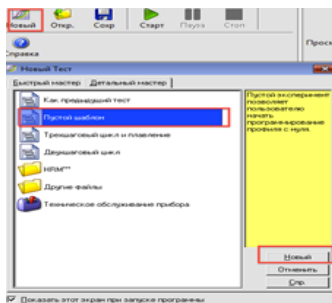
В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

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.

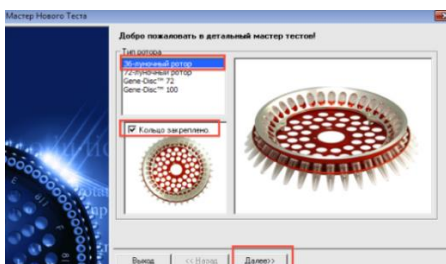
Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» **3000** / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**/ для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**.

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**».

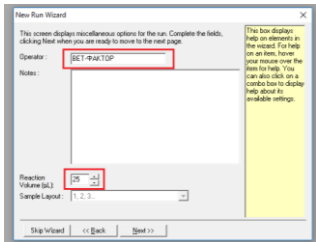


3. Выбрать тип ротора. Например, «**36-Well Rotor**»/«**36-луночный ротор**» при использовании ротора на 36 образцов. Поставить отметку в окошке рядом с надписью «**No Domed 0.2 ml Tubes**»/«**Locking ring attached**»/«**Кольцо закреплено**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



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 «**ОК**».

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

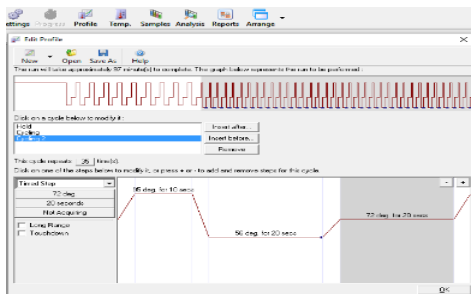
№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 30 сек	10
	60°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°C – 20 сек, детекция JOE/Yellow, FAM/Green	
	72°C – 20 сек	

Для этого требуется проделать следующие шаги:

-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» 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.

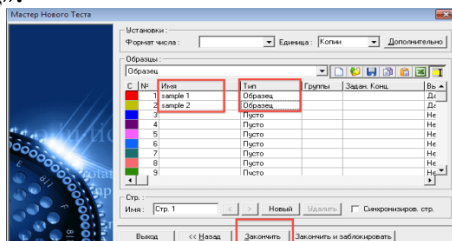
-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New cycling»/«Новое циклирование», установить параметры циклирования в соответствии с пунктом 3 таблицы 4.



6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку **«Calibrate/Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.»**. В открывшемся окне нажать кнопку **«Опт.детек-мых»**. 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»**. Закрыть окно **«Авто-оптимизация уровня сигнала»**. Нажать кнопку **«Next»/«Далее»**.

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

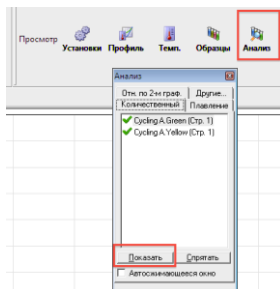
8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню **«Тип»** как **«Unknown»/ «Образец»**.



После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

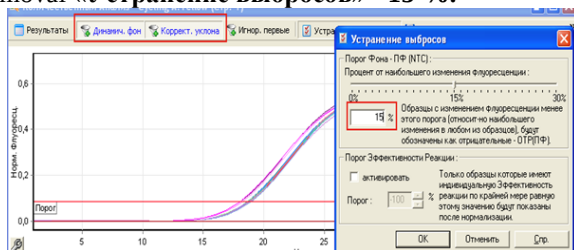
Анализ результатов амплификации для канала FAM/ Green:

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



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**).

В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 15%.



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

Количественный Анализ - Cycling A.Green (Page 1)

Результаты: ☒ Динамич. фон ☒ Коррект. уклона ☐ Игнор. первые ☒ Устранение выбросов

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

Nº	Имя	Тип	CT	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 **JOE/Yellow**:

³ Если для отрицательного контроля этапа ПЦР **K-** 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.

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

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**).

В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 15⁴ %.

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

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 «Сt» для исследуемого образца).

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-ЛЕЙКОЗ-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-ЛЕЙКОЗ-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

⁴ 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.

Создать программу амплификации «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-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. Детекцию осуществлять после стадии отжиг в соответствии с пунктом 3 таблицы 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации на ДТ 96.

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 30 сек	10
	60°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°C – 20 сек, детекция HEX, FAM	
	72°C – 20 сек	

Нажать «ОК» и сохранить программу под именем «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-ФАКТОР». При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8. При запуске прибора выбрать «Работа с прибором» и «Добавить тест». В окне добавления теста выбрать «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-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. Нажать на иконку с изображением папки  и выбрать файл, в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа «Ст(Ср) для всех каналов». Метод – «Пороговый (St)». 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-ЛЕЙКОЗ-КРС-ФАКТОР» → «Отчеты» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год. месяц. число-данные». Нажать сохранить.

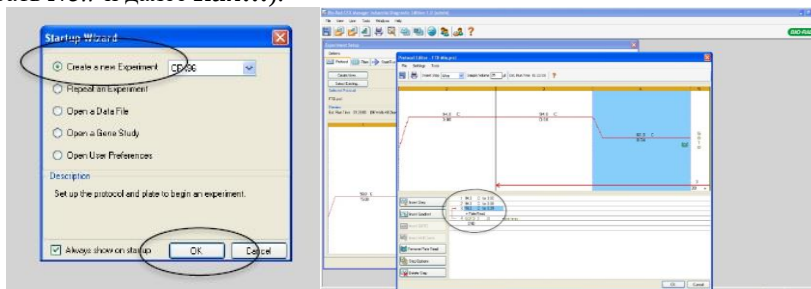
17. Нажать клавишу «Заккрыть».

18. Заккрыть 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...**).



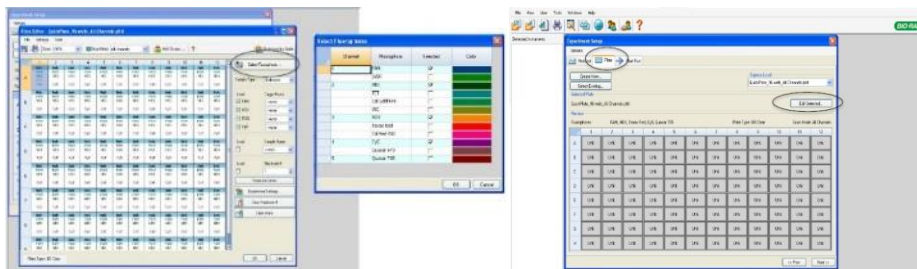
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на CFX96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 30 сек	10
	60°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°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.



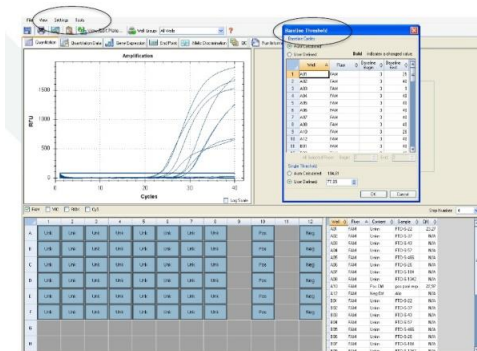
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-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 (ВКО).

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 C_t .

Анализ результатов амплификации для канала HEX (ДНК вируса лейкоза).

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 «**K+**» 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 C_t .

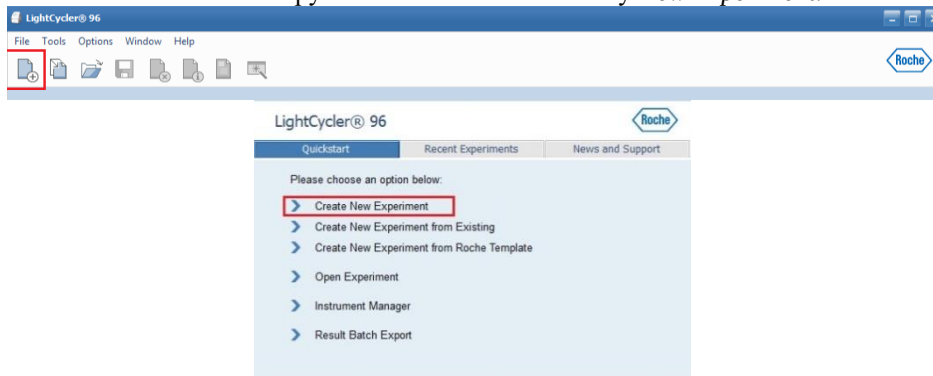
12. Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла « C_t » для исследуемого образца.

Приложение 4. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

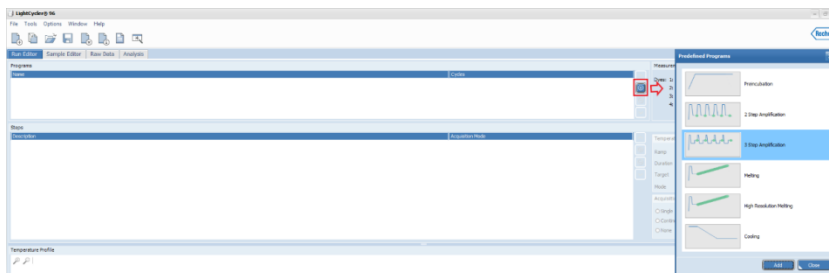
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее он проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

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 экрана *Programs* появится стадия *Preincubation*. Аналогичным образом добавьте стадию *3 step Amplification* 2 раза, после чего закройте окно *Predefined Programs*.

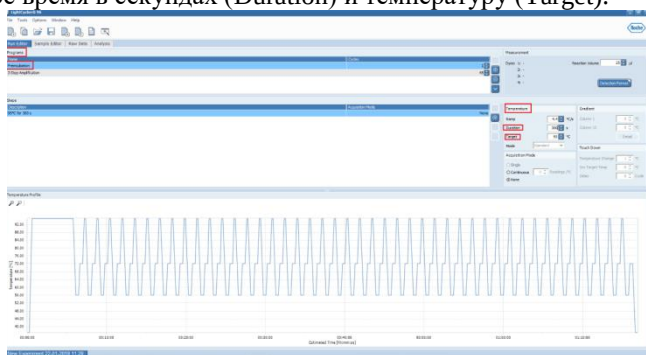


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 7.

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 – 30 сек	10
	60°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°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. Аналогичным образом задайте необходимые время и температуру для второго циклирования. 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.

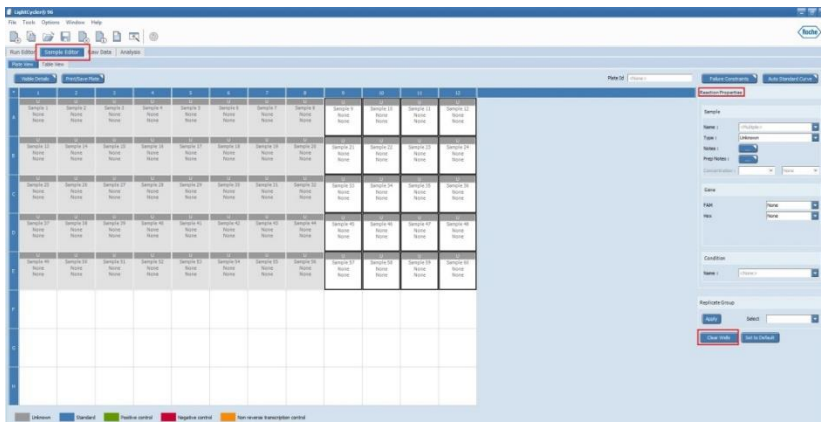
В окне Reaction Volume, в разделе Measurement (в правой части окна) укажите объем реакции равный 25 мкл.

Под Reaction Volume нажмите вкладку  и отметьте флуорофоры Fam и Hex.

Channel	Dye	Quant Factor	Melt Factor
Channel 1, 470/514	☐ SYBR Green 1	20.00	1.20
	☐ Resolight	20.00	1.20
	☒ FAM	10.00	1.20
	☐		
Channel 2, 533/572	☐ VIC	10.00	1.20
	☒ Hex	10.00	1.20
	☒ Yellow555	10.00	1.20
	☐		
Channel 3, 577/620	☐ Red610	10.00	1.20
	☐ Texas Red	10.00	1.20
	☐		
	☐		
Channel 4, 645/667	☐ Cy5	10.00	1.20
	☐		

4. Перейдите на вкладку Sample Editor⁵ (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:

⁵ 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 – BLV.

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.

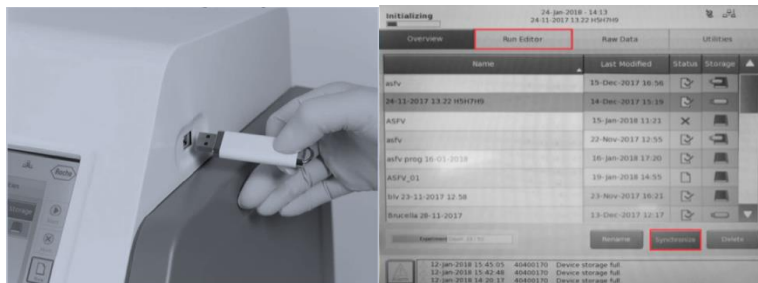


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler® 96 (.lc96)

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.

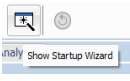
Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB  появится на панели состояния программы прибора LightCycler® 96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке *Overview*.



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 отображаться 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®.

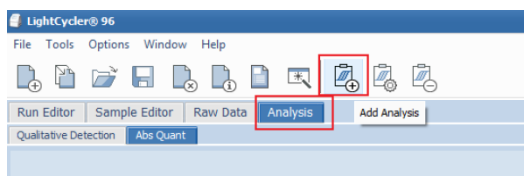


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

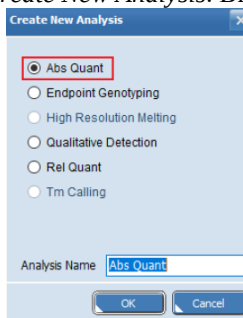
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

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*

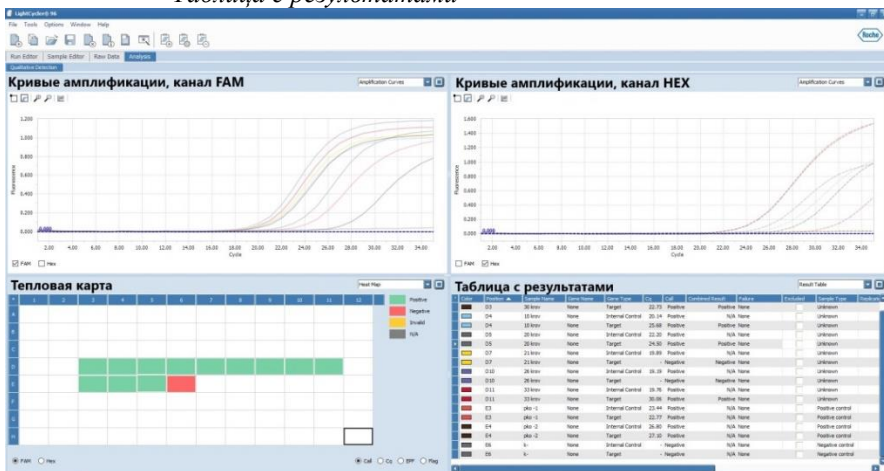


Нажмите *OK*. Во вкладке *Analysis* в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента:

- *Кривые амплификации*
- *Стандартные кривые⁶*

⁶ окно Стандартные кривые не будет содержать никаких данных, поскольку в наборах не предусмотрен вариант количественного анализа

- 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 Date), 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.



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. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 09.01.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 3 «Порядок работы на приборе LightCycler® 96»
Версия 1.2 от 06.03.2018	Пункт «8. Интерпретация результатов анализа»	По тексту
Версия 1.3 от 25.04.2019	Пункты 1 «Назначение» и 6 «Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб» Инструкции	Добавлены продукты питания в исследуемый материал
Версия 1.4 от 15.05.2019	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 2 «Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)»
Версия 1.5 от 28.01.2021	Таблица 4	Исправлено время для первого шага: вместо «3 мин» - «5 мин»
Версия 1.6 от 25.05.2021	стр. 5, стр. 9	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.7 от 12.11.2021	По тексту	Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды. Изменения по тексту
Версия 1.8 от 10.01.2022	По тексту	Изменено название ВКО

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.9 от 21.02.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке
Версия 1.10 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 1.11 от 28.09.2022	Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Ст)
Версия 1.12 от 28.11.2022	Раздел 2.2. Состав набора. По тексту	В серии 1122D118 изменён ВКО – вместо ВКО Т2 теперь ВКО BLV
Версия 1.13 от 14.12.2022	Раздел 2.2. Состав набора. По тексту	Изменён ВКО – вместо ВКО BLV теперь ВКО Т2

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-ФАКТОР» либо других 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