



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-ФАКТОР» для выявления РНК вируса Лихорадки Западного Нила (West Nile Virus) в биологическом материале методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ ПЦР РВ)

ТУ 21.10.60-357-51062356-2022

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 характеристики.....	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование	6
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	8
7. Проведение анализа	9
8. Интерпретация результатов анализа	10
9. Условия транспортирования	12
10. Условия хранения	12
11. Срок годности	12
Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций	13
Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).	14
Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)..	19
Приложение 4. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)	21
Приложение 5. Лист вносимых изменений	23

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
ОТ	обратная транскрипция
РНК	рибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная ДНК
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления РНК вируса лихорадки Западного Нила (West Nile Virus) в биологическом материале от животных (цельная кровь, плазма крови, ткани мозга), а также комарах и клещах, культурах микроорганизмов, смывах с поверхностей методом обратной транскрипции и амплификации кДНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор реагентов основан на использовании двух последовательных реакций: обратной транскрипции вирусной РНК для получения кДНК и полимеразной цепной реакции для амплификации фрагмента полученной кДНК матрицы. Обе реакции проводятся последовательно в одной ПЦР-пробирке (one-tube), что сокращает и упрощает процедуру анализа, снижает риск контаминации и возможность ошибки при переносе кДНК в другую пробирку для ПЦР. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома вируса Лихорадки Западного Нила и внутреннего положительного контроля (бактериофага MS2) в мультиплексной полимеразной цепной реакции.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения обратной транскрипции и мультиплексной ПЦР РВ (комплект № 1) и 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 WNV	прозрачная бесцветная жидкость*	275	550	1
2	Буфер для проведения, ПЦР БУФЕР WNV	прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
3	Смесь ферментов, RT PCR ENZ.	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	45	90	1
4	Буфер для разведения РНК, РНК 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 М1	прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО WNV	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор не входят реактивы для экстракции НК. Выделение РНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

* Возможна легкая опалесценция

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении НК других микроорганизмов: герпесвирусов I и II типов вируса клещевого энцефалита, Лангат, Повассан, Японского, Омской геморрагической лихорадки, ECHO, Coxsackie, Rickettsia conorii ssp. R.heilongiangensis, Coxiella burnetii, Bartonella henselae, B.quintana, Borrelia miyamotoi; Treponema pallidum; Leptospira interrogans, L.kirshneri, L.borgpetersenii.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК КРС, лошадей, свиньи, курицы, человека, а также комаров и клещей.

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 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 РНК 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 и без (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 РНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология; «CFX96», Biorad 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, «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.

При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение

Для исследования используют следующий материал:

- Цельную кровь забирают в пробирку с ЭДТА, желательно использовать одноразовые системы взятия крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.
- Ткани мозга павших животных отбирают в стерильный контейнер.
- Кровососущие насекомые, переносчики вируса (комары, клещи), отбирают не менее 20 особей в контейнер. 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:

- 1) Цельная кровь:
 - при температуре 2 - 8 °С - в течение 12 ч с момента взятия материала.
- 2) Другие образцы:
 - при температуре 2 - 8 °С - в течение 1 суток;
 - при температуре не выше минус 16 °С - в течение 1 недели;
 - при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемых проб

Пробы цельной крови с ЭДТА используют без предварительной подготовки. Для экстракции РНК используют 50 мкл цельной крови. Культуры микроорганизмов и питательные среды, смывы с поверхностей используют для выделения РНК без предварительной подготовки. Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 °С до 8 °С более 1 ч после ее взятия, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Переносят плазму в

количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Из тканей мозга вырезают небольшие кусочки до 1 г весом. Растирают в отдельных фарфоровых ступках, добавляют по 5-10 мл стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при комнатной температуре в течение 3 мин, после чего переносят 50 мкл верхней фазы в пробирки типа «Эппендорф» и используют для экстракции РНК.

Пробу комаров растирают в 1 мл стерильного физиологического раствора с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или гомогенизаторов. Полученные суспензии центрифугируют при 12.000 об/мин в течение 1 мин. Пробы клещей гомогенизируют с использованием автоматических гомогенизаторов. Затем добавляют стерильный физраствор (допускается также использование дистиллированной воды) для получения 10-25% суспензии и центрифугируют 10.000 об./мин в течение минуты. Аликвоту надосадочной жидкости (100 мкл) используют для экстракции НК.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

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

Примечание. Реакция ОТ-ПЦР РВ проводится в одной пробирке.

7.1 Экстракция (выделение) НК из клинического материала

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО М1**.

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

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

Выделенную РНК можно хранить до 3 часов при температуре от 2°C до 8°C или в течение месяца при температуре не выше минус 68°C.

7.2 Подготовка образцов к проведению ОТ-ПЦР РВ

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

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО WNV, ВКО М1 и РНК буфера**.

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

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

5 мкл ПЦР СМЕСЬ WNV
10 мкл ПЦР БУФЕР WNV
0,75 мкл RT PCR ENZ

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций указан в Приложении 1.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации НК 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 **РНК буфера**;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 10 мкл НК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) 10 мкл **ПКО WNV**.

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку (например, ДТ-96) **запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!**

7.3 Проведение ОТ-ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией

Параметры температурно-временного режима амплификации на приборах «Rotor-Gene Q», «ДТ-96», «CFX96» и LightCycler® 96 указаны в Приложениях 2, 3, 4 и 5 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 2, 3, 4 и 5 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 соответствии с инструкцией производителя к прибору и в соответствии с Приложениями 2, 3, 4 и 5 Инструкции.

Учет результатов ОТ-ПЦР РВ 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 НК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

Проба	Канал детекции		Результат
	FAM/Green	Cy5/Red	
	WNV	BKO	
ПКО К+	До 31	до 31	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
РНК 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 37	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>РНК вируса лихорадки Западного Нила присутствует</i>
	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 для исследуемого образца по каналу **FAM/Green** значение Ct определяется позднее 37 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 **FAM/Green** > 37), требуется повторное взятие материала от того же животного для проведения ПЦР-исследования и (или) использование альтернативных методов диагностики.

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-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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 -18 до -20°С;
- 2) Комплект №2 (см. Табл. 2) при температуре от 2 до 8°С.

11. Срок годности

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

Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций

Количество реакций	Объем ПЦР БУФЕРА WNV, мкл	Объем ПЦР СМЕСИ WNV, мкл	Объем RT PCR ENZ, мкл
5	50	25	3,8
10	100	50	7,5
15	150	75	11,3
19	190	95	14,3
23	230	115	17,3
27	270	135	20,3
31	310	155	23,3
35	350	175	26,3
39	390	195	29,3
43	430	215	32,3
47	470	235	35,3
51	510	255	38,3
55	550	275	41,3
59	590	295	44,3
63	630	315	47,3
67	670	335	50,3
71	710	355	53,3
75	750	375	56,3
79	790	395	59,3
83	830	415	62,3
87	870	435	65,3
91	910	455	68,3
95	950	475	71,3

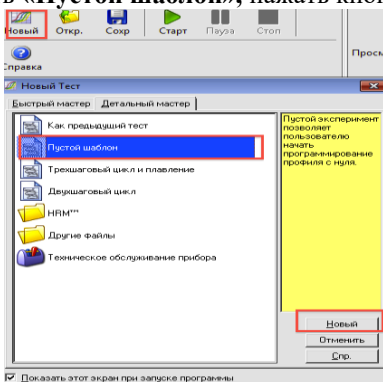
Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

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

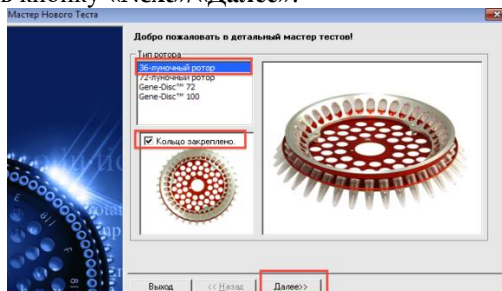
При работе с прибором Rotor-Gene 3000 используют программу Rotor-Gene версии 6 или выше, с приборами Rotor-Gene6000и Rotor-GeneQ – используют программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build67) или выше.

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)**.

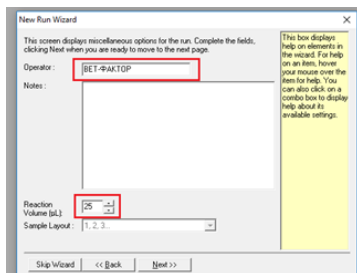
1. Открыть программу «**Rotor Gene Q**».
2. Выбрать в основном меню программы значок «**New**»/«**Новый** В открывшемся окне выбрать «**Пустой шаблон**», нажать кнопку «**New**»/«**Новый**».



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	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 20 сек	45
	55°C – 30 с детекция FAM/Green; Cy5/Red	
	72°C – 30 сек	

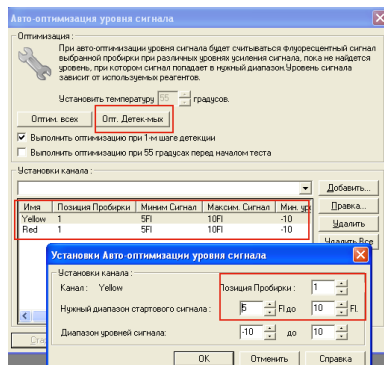
Для этого требуется проделать следующие шаги:

- Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры», установить температуру 50°C и время 30 мин ;

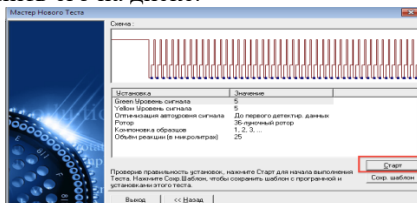
- Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры» установить температуру 95°C и время 5 мин.

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

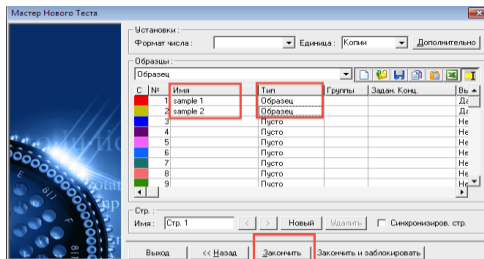
6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «**Calibrate/Gain Optimisation...**»/«**Опт.уровня сигн.**». В открывшемся окне нажать кнопку «**Опт.детек-мых**». Для обоих каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading** /минимальный сигнал - 5, **Max Reading** /максимальный сигнал — 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 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».



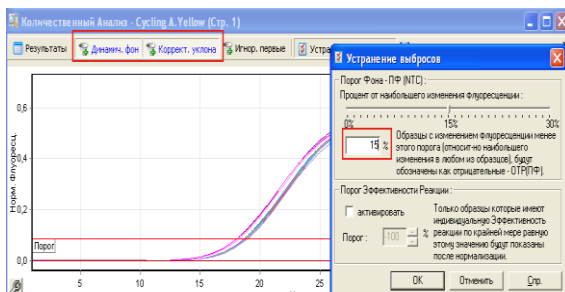
9. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

Анализ результатов амплификации для канала FAM/Green (вирус Лихорадки Западного Нила).

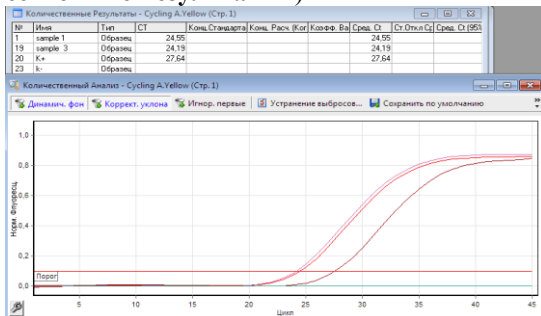
10. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. Green», далее «Show»/«Показать».

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



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



Анализ результатов амплификации для канала Cy5/Red (BKO).

14. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. Cy5/Cycling A. Red**, 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 отрицательных контролей этапов экстракции или ПЦР (BK-, 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.

17. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить **Threshold/Порог** =0,05.

В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения C_t .

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.

² Если для отрицательного контроля этапа ПЦР **К**- на канале Cy5/ Red 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 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием **«ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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 – Cy5; FAM

Создать программу амплификации **«ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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, таблица 5. Детекцию осуществлять после стадии отжига.

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

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 20 сек	45
	58°C – 30 с детекция FAM, CY5	
	72°C – 30 сек	

Нажать **«ОК»** и сохранить программу под именем **«ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-ФАКТОР»**. При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8. При запуске прибора выбирать **«Работа с прибором»** и **«Добавить тест»**. В окне добавления теста выбрать **«ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-ФАКТОР»**.

9. В разделе **«1. Образцы»** введите количество образцов включая все контрольные образцы. В разделе **«3. Контроли»** поставить нули и нажать **«ОК»**.

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

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

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

Анализ результатов амплификации

12. 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)».

13. 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%. Нажать кнопку «Применить».

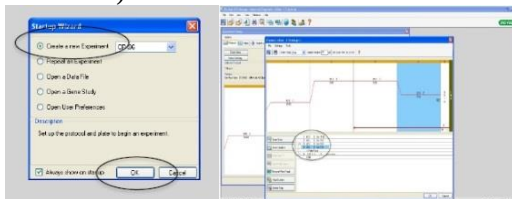
14. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку  . В верхней части окна нажать клавишу «Печать» или «Сохранить», выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее «Рабочий стол» → «ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-ФАКТОР» → «Отчеты» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести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

15. 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 4. 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 с данными из таблицы 6.

Таблица №6 Температурно-временной режим амплификации на CFX96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	55°C – 15 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 20 сек	45
	58°C – 30 с детекция FAM, CY5	
	72°C – 30 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 **Cy5** 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.



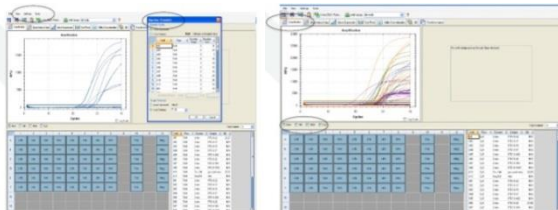
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «**ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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

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



8. 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.

9. В таблице результатов появятся значения **St**.

Анализ результатов амплификации для канала Cy5/Red (BKO)

10. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **Cy5/Red**, 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 появятся значения **St**.

*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 «**St**» для исследуемого образца.*

Приложение 5. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 18.11.2021	По тексту	Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды. Изменения по тексту
Версия 1.2 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.3 от 22.02.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке образцов
Версия 1.4 от 29.04.2022	Приложения 2, 3, 4	Изменен температурно-временной режим амплификации
	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала
Версия 1.5 от 28.09.2022	Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Сt)

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-ЛИХОРАДКА-ЗАПАДНОГО-НИЛА-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