



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-ФАКТОР» для выявления ДНК *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

ТУ 21.10.60-347-51062356-2022

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 .....                                                                                             | 8  |
| 6.2 Подготовка исследуемого материала .....                                                                                            | 9  |
| 7. Проведение анализа .....                                                                                                            | 9  |
| 7.1 Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб .....                                                                                | 9  |
| 7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР .....                                                                                         | 10 |
| 7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией .....                                                                         | 10 |
| 8. Интерпретация результатов анализа .....                                                                                             | 11 |
| 9. Условия транспортирования .....                                                                                                     | 12 |
| 10. Условия хранения .....                                                                                                             | 13 |
| 11. Срок годности .....                                                                                                                | 13 |
| Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000<br>(Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) ..... | 13 |
| Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология,<br>Россия) .....                                                        | 18 |
| Приложение 3. Порядок работы на приборе LightCycler® 96 .....                                                                          | 20 |
| Приложение 4. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) .....                                                                     | 27 |
| Приложение 5. 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 в режиме реального времени |
| ДНК    | дезоксирибонуклеиновая кислота                         |
| НК     | нуклеиновая кислота                                    |
| СП     | санитарные правила                                     |
| МУ     | методические указания                                  |

## 1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* в биологическом материале: пробы назальных и конъюнктивных смывов, истечений; пробы синовиальной жидкости суставов; цельная кровь, материал от замерших эмбрионов (желток, аллантоисная жидкость, хорион-аллантоисная оболочка), от эмбрионов-задохликов (трахея, легкие); кусочки паренхиматозных органов (селезенка, легкие), трахеи, воздухоносных мешков от павшей птицы, 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 *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выплечения 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, <b>ПЦР СМЕСЬ ГАЛ/СИН</b> | прозрачная бесцветная жидкость*       | 275           | 550            | 1      |
| 2 | Буфер для проведения ПЦР, <b>ПЦР БУФЕР ГАЛ/СИН</b> | прозрачная бесцветная жидкость        | 550           | 1100           | 1      |
| 3 | ДНК полимеразы, <b>TAQ POLYMERASE</b>              | прозрачная бесцветная вязкая жидкость | 30            | 60             | 1      |
| 4 | Буфер для разведения ДНК, <b>ДНК БУФЕР</b>         | 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 |        |
| 5 | Внутренний контрольный образец, <b>ВКО Т1</b>                        | прозрачная бесцветная жидкость* | 550           | 1100           | 1      |
| 6 | Отрицательный контрольный образец, <b>ОКО (ТЕ буфер)<sup>1</sup></b> | прозрачная бесцветная жидкость  | 1500          | 2000           | 1      |
| 7 | Положительный контрольный образец, <b>ПКО ГАЛ/СИН</b>                | 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

<sup>1</sup> 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: *Bordetella bronchiseptica*; *Brucella suis*; *Campylobacter jejuni*; *Chlamydia suis*; *Chlamydophila pecorum*; *Clostridium perfringens*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis*; *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma faucium*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyopharyngis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma mycoides capri*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma pneumoniae*; *Pasteurella multocida*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Dublin*; *Shigella flexneri*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus suis*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК КРС, свиньи, собаки, курицы, козы 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 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 FV-2400, Biosan);
- 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 «ГЭТА-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, «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**

Для исследования используют следующий материал:

Набор предназначен для выявления ДНК *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* в биологическом материале:

- пробы назальных и конъюнктивальных смывов, истечений;
- пробы синовиальной жидкости суставов
- цельная кровь
- кровь, консервированную 6% ЭДТА, из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл
- материал от замерших эмбрионов (желток, аллантоисная жидкость, хорион-аллантоисная оболочка), от эмбрионов-задохликов (трахея, легкие);
- кусочки паренхиматозных органов, трахеи, воздухоносных мешков от павшей птицы. из тканей и органов вырезают кусочки размером 1х1х1 см (при невозможности толщина кусочков может быть меньше);
- 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:

Цельная кровь:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение 12 ч с момента взятия материала

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 исследуемого материала

Пробы цельной крови с ЭДТА, пробы назальных, конъюнктивальных, урогенитальных смывов и истечений, пробы синовиальной жидкости, 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 тканей и органов (паренхиматозные органы, трахеи, воздухоносные мешки) вырезают небольшие кусочки до 1 г весом, гомогенизируют (с использованием фарфоровых ступок и пестиков или при помощи автоматических гомогенизаторов), затем обычно готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Образовавшуюся суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем верхнюю фазу отбирают. Аликвоту надосадочной жидкости (100 мкл) используют для выделения НК.

При исследовании куриных эмбрионов в скорлупе прокалывают отверстие иглой со стерильным шприцем или пастеровской пипеткой с фильтром и отбирают в пробирку объемом 1,5 мл 1,0-1,5 мл аллантоисной жидкости, используют 100 мкл в выделение.

*На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.*

## 7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
- 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 **ОКО<sup>2</sup>** (пробирку обозначить как **ВК-**).

---

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

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 ГАЛ/СИН, 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:

**5 мкл ПЦР СМЕСЬ ГАЛ/СИН;  
10 мкл ПЦР БУФЕР ГАЛ/СИН;  
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 буфер**;
- 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 ГАЛ/СИН.**

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

## 7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией

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

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Запрограммировать 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 контрольных образцов.

| Проба           | Канал детекции          |                    |                                        | Результат                                                                                         |
|-----------------|-------------------------|--------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | JOE(HEX)/<br>Yellow     | ROX/Orange         | FAM/Green                              |                                                                                                   |
|                 | <i>M. gallisepticum</i> | <i>M. synoviae</i> | <i>BKO</i>                             |                                                                                                   |
| ПКО<br>K+       | До 31                   | До 31              | до 31                                  | Реакции положительного и внутреннего контролей <b>прошли успешно</b>                              |
| ДНК буфер<br>K- | Сигнал отсутствует      | Сигнал отсутствует | Сигнал отсутствует                     | Реакция <b>прошла успешно</b>                                                                     |
|                 | Любое значение          | Любое значение     | Сигнал отсутствует                     | Специфическая контаминация! <b>ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!</b> Рекомендуется поставить смывы  |
|                 | Сигнал отсутствует      | Сигнал отсутствует | Любое значение                         | Контаминация ВКО! <b>ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!</b> Рекомендуется поставить смывы            |
| ОКО<br>BK-      | Сигнал отсутствует      | Сигнал отсутствует | Любое значение от 1 до 32              | Экстракция <b>прошла успешно</b>                                                                  |
|                 | Любое значение          | Любое значение     | Сигнал отсутствует или любое значение  | Специфическая контаминация! <b>ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!</b> Рекомендуется поставить смывы. |
|                 | Сигнал отсутствует      | Сигнал отсутствует | Сигнал отсутствует или значение Ct >32 | Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. <b>ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!</b> |

| Проба   | Канал детекции            |                           |                                        | Результат                                                                                  |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | JOE(HEX)/Yellow           | ROX/Orange                | FAM/Green                              |                                                                                            |
|         | <i>M. gallisepticum</i>   | <i>M. synoviae</i>        | <i>BKO</i>                             |                                                                                            |
| Образцы | Любое значение от 1 до 32 | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует или любое значение  | Результат анализа <b>положительный.</b><br><i>ДНК M. gallisepticum</i> <b>присутствует</b> |
|         | Сигнал отсутствует        | Любое значение от 1 до 32 | Сигнал отсутствует или любое значение  | Результат анализа <b>положительный.</b><br><i>ДНК M. synoviae</i> <b>присутствует</b>      |
|         | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует        | Любое значение от 1 до 32              | Результат анализа <b>отрицательный</b>                                                     |
|         | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует или значение Ct >32 | Результат не достоверный.<br><b>ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!</b>                        |

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 и/или ROX (Orange) значение 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 и/или ROX (Orange) более 32), 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-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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.

## 11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

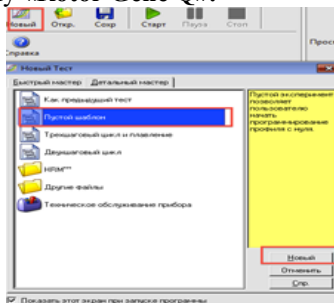
## Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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.

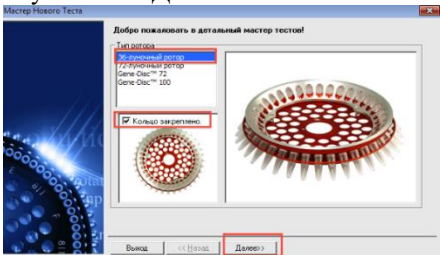
Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» 3000 / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» 6000 (Q) для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» 6000 (Q).

### 1. Открыть программу «Rotor Gene Q».

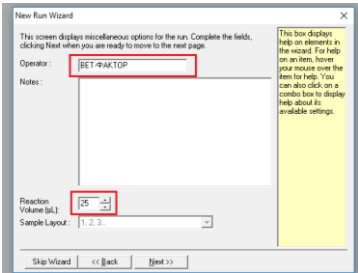


2. Выбрать в основном меню программы значок «New»/«Новый В открывшемся окне выбрать «Пустой шаблон», нажать кнопку «New»/«Новый

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».

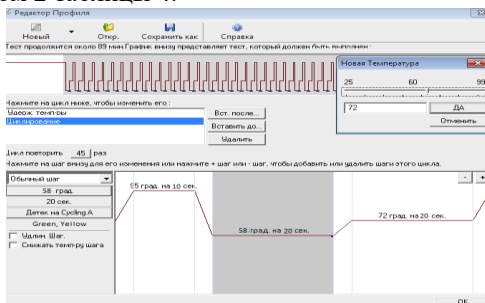
Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации

| № | Температурно-временной режим                            | Число циклов |
|---|---------------------------------------------------------|--------------|
| 1 | 95°C – 10 мин                                           | 1            |
| 2 | 95°C – 20 сек                                           | 5            |
|   | 60°C – 20 сек                                           |              |
|   | 72°C – 20 сек                                           |              |
| 3 | 95°C – 10 сек                                           | 35           |
|   | 60°C – 20 с, детекция JOE/Yellow; FAM/Green; ROX/Orange |              |
|   | 72°C – 20 сек                                           |              |

Для этого требуется проделать следующие шаги:

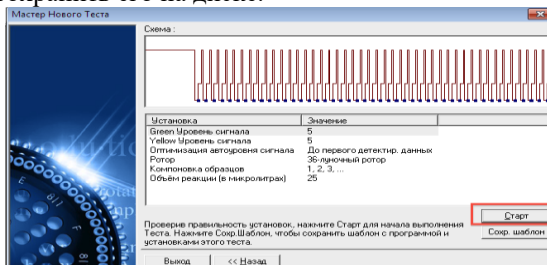
-Нажать клавишу «Insert before»/«Вставить до» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры», установить температуру 95°C и время 10 мин ;

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



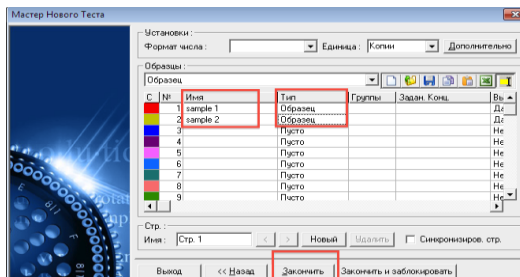
6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «Calibrate/Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.»». В открывшемся окне нажать кнопку «Опт.детек-мых». Для всех каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading /минимальный сигнал - 5, Max Reading /максимальный сигнал — 15**. В графе «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.



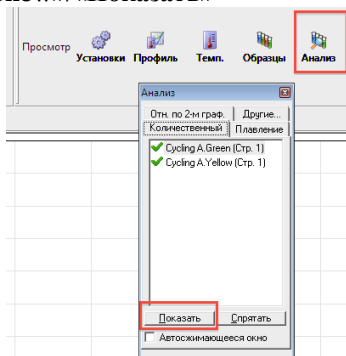
8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню Тип как Unknown «Образец».

После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.



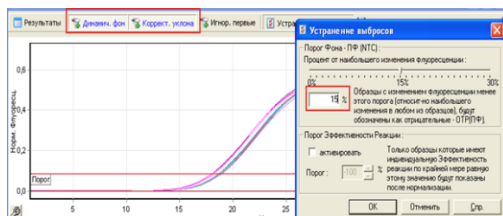
## Анализ результатов амплификации для канала FAM/ Green (ВКО)

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<sup>3</sup> %.



<sup>3</sup> 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.

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

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

| № | Имя      | Тип     | CT    | Конц. Стандарта | Конц. Рэсч. (>) |
|---|----------|---------|-------|-----------------|-----------------|
| 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 канала JOE/Yellow (ДНК Mycoplasma gallisepticum)

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»** - 15 <sup>4</sup>%.

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

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

Анализ результатов канала ROX/Orange (ДНК Mycoplasma synoviae) выполняют аналогично каналу JOE/Yellow.

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).

---

<sup>4</sup> Если для отрицательных контролей этапов экстракции или ПЦР (**ВК-**, **К-**) на канале JOE (HEX)/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 прибора ДТ-96 или переустановки программы необходимо создать протокол с названием «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-ФАКТОР».

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-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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; ROX

Создать программу амплификации «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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 отжига.

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

| № | Температурно-временной режим        | Число циклов |
|---|-------------------------------------|--------------|
| 1 | 95°C – 6 мин                        | 1            |
| 2 | 95°C – 20 сек                       | 5            |
|   | 60°C – 20 сек                       |              |
|   | 72°C – 20 сек                       |              |
| 3 | 95°C – 10 сек                       | 35           |
|   | 60°C – 20 с, детекция HEX; FAM; ROX |              |
|   | 72°C – 20 сек                       |              |

Нажать «ОК» и сохранить программу под именем «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-ФАКТОР». При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8 При запуске прибора выбрать «Работа с прибором» и «Добавить тест». В окне добавления теста выбрать «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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 приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать «**Просмотр архива**».

13 Далее 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-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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**».

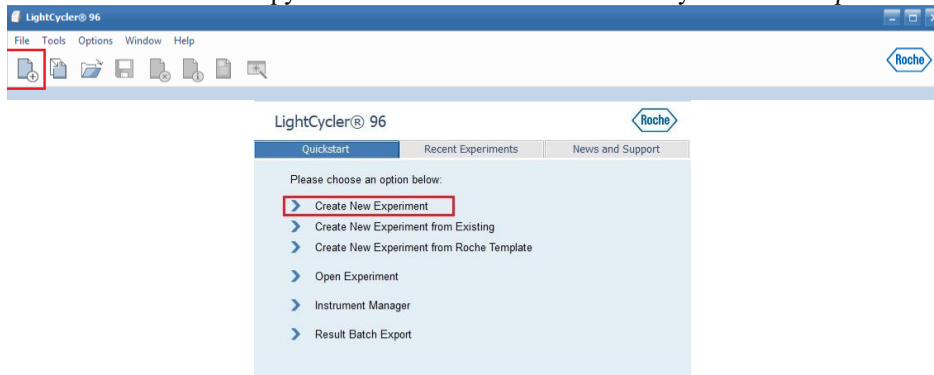
Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «St» для исследуемого образца.

### Приложение 3. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

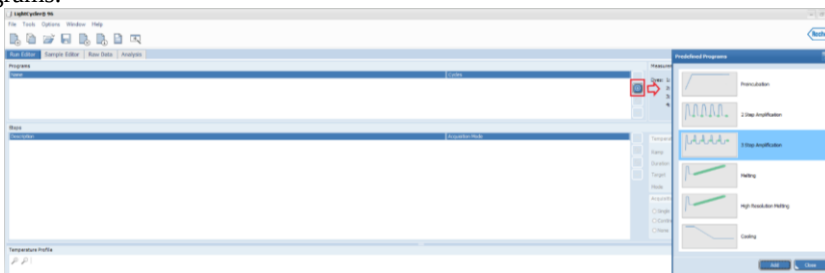
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

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 два раза стадию *3 step Amplification*, после чего закройте окно *Predefined Programs*.

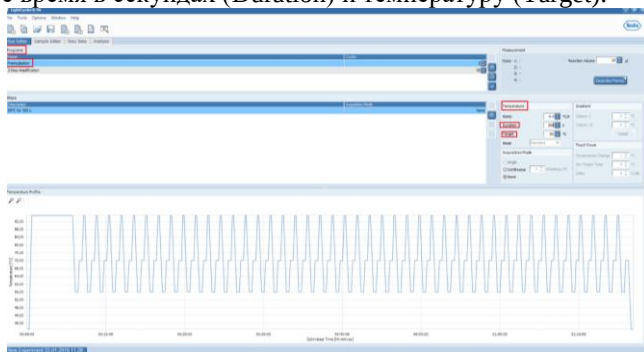


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 6.

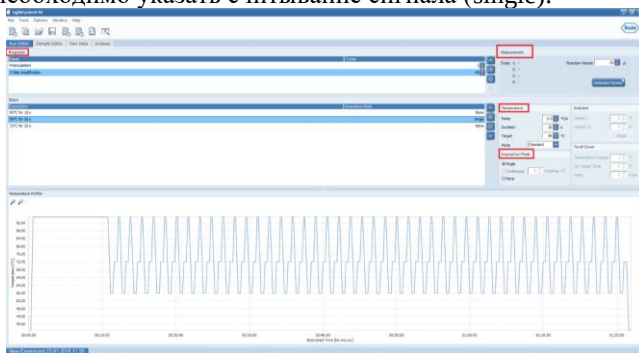
Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

| № | Температурно-временной режим              | Число циклов |
|---|-------------------------------------------|--------------|
| 1 | 95°C – 360 сек                            | 1            |
| 2 | 95°C – 20 сек                             | 5            |
|   | 60°C – 20 сек                             |              |
|   | 72°C – 20 сек                             |              |
| 3 | 95°C – 10 сек                             | 35           |
|   | 60°C – 20 с, детекция HEX; FAM; Texas Red |              |
|   | 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).

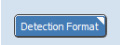


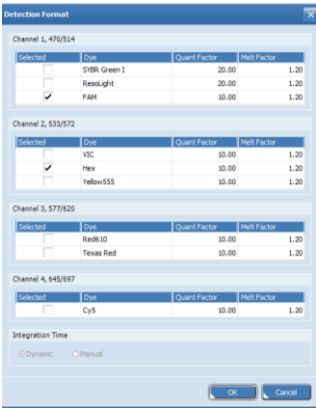
Далее в левой верхней части окна в разделе Programs выберите 3 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. Аналогичным образом задайте необходимое время и температуру 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



Detection Format

Channel 1, 470/514

| Selected                            | Dye          | Quant Factor | Molt Factor |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| <input type="checkbox"/>            | SYBR Green I | 20.00        | 1.20        |
| <input type="checkbox"/>            | Resolight    | 20.00        | 1.20        |
| <input checked="" type="checkbox"/> | FAM          | 10.00        | 1.20        |

Channel 2, 533/572

| Selected                            | Dye       | Quant Factor | Molt Factor |
|-------------------------------------|-----------|--------------|-------------|
| <input type="checkbox"/>            | VIC       | 10.00        | 1.20        |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Hex       | 10.00        | 1.20        |
| <input type="checkbox"/>            | Yellow555 | 10.00        | 1.20        |

Channel 3, 577/620

| Selected                 | Dye       | Quant Factor | Molt Factor |
|--------------------------|-----------|--------------|-------------|
| <input type="checkbox"/> | Red640    | 10.00        | 1.20        |
| <input type="checkbox"/> | Texas Red | 10.00        | 1.20        |

Channel 4, 645/687

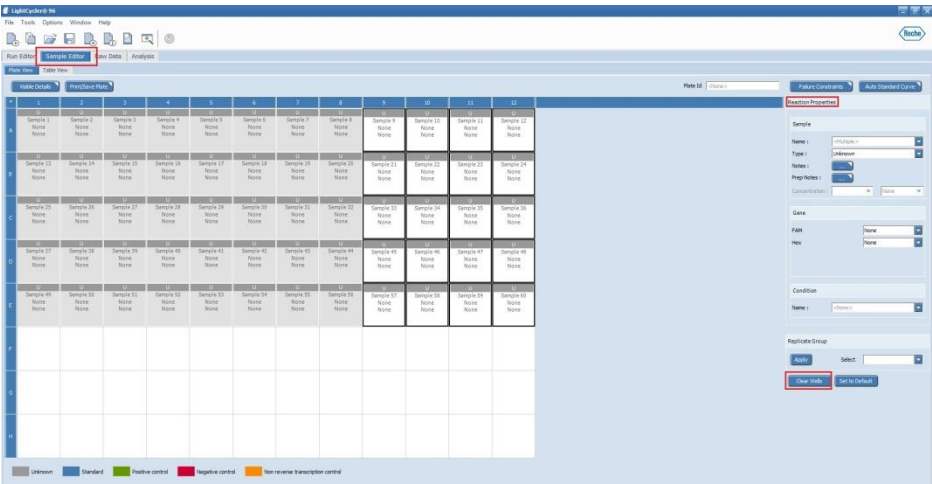
| Selected                 | Dye | Quant Factor | Molt Factor |
|--------------------------|-----|--------------|-------------|
| <input type="checkbox"/> | Cy5 | 10.00        | 1.20        |

Integration Time

☐ Dynamic ☐ Manual

OK Cancel

4. Перейдите на вкладку Sample Editor<sup>5</sup> (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:



Sample Editor

Plate 10: Untitled

Columns: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Rows: A B C D E F G H

Legend: Confusion, Standard, Positive control, Negative control, Non-reverse transcription control

Right Panel: Reaction Properties

Sample Name: [Dropdown]

Type: [Dropdown]

Notes: [Text Area]

Flag Notes: [Text Area]

Calibration: [Dropdown]

Gain: FAM, Hex

Condition: Name: [Dropdown]

Replicate Group: [Dropdown]

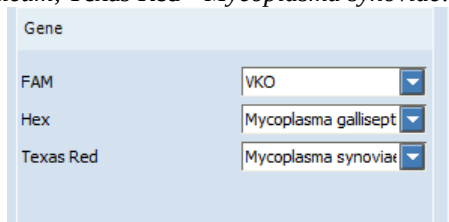
Buttons: Apply, Select, Clear Wells, Set to Default

<sup>5</sup> Образцы можно редактировать до или после поставки эксперимента: программа будет снимать данные флуоресценции по всем выбранным каналам детекции со всех 96 лунок по умолчанию

22

Версия 1.9 от 28.09.2022

В окне Gene задайте наименования мишеней: FAM – vko, Hex – *Mycoplasma gallisepticum*, Texas Red – *Mycoplasma synoviae*.



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.

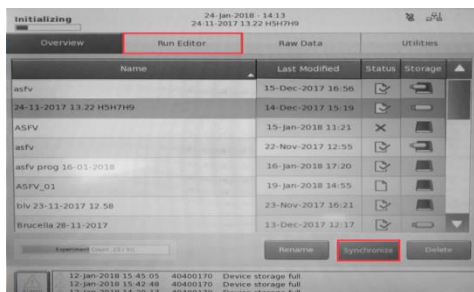


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler® 96 (.lc96)

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.

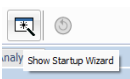
### 6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя

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®.

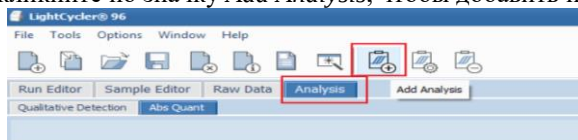


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

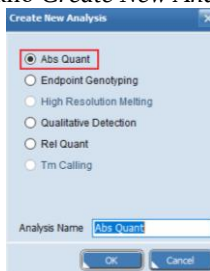
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

## 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.



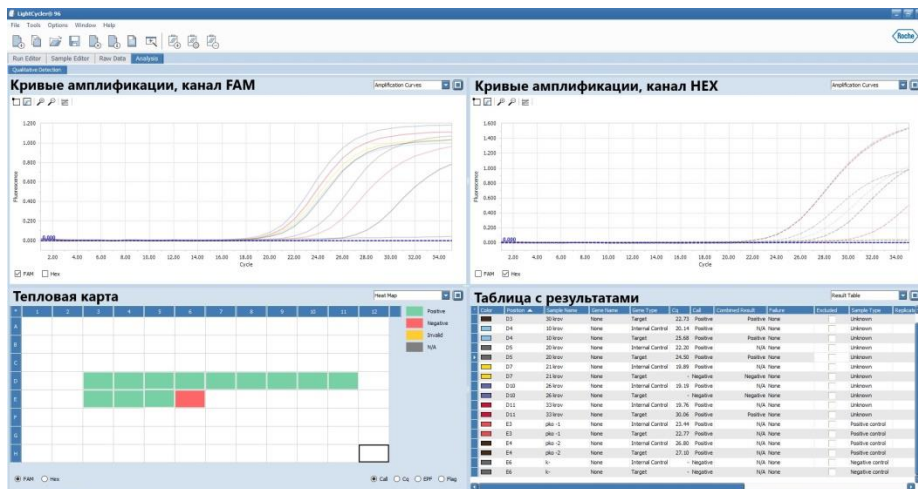
Откроется диалоговое окно *Create New Analysis*. Выберите *Abs Quant*



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

- *Кривые амплификации*
- *Стандартные кривые<sup>6</sup>*
- *Тепловая карта*
- *Таблица с результатами*

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



*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

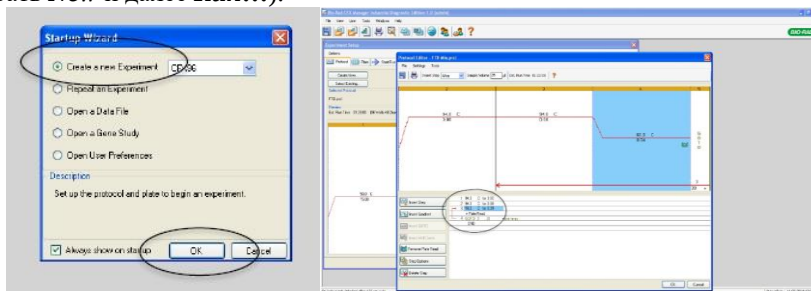
Для образцов форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается некорректный или отрицательный результат необходимо провести повторный анализ с этапа экстракции.



*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...**).



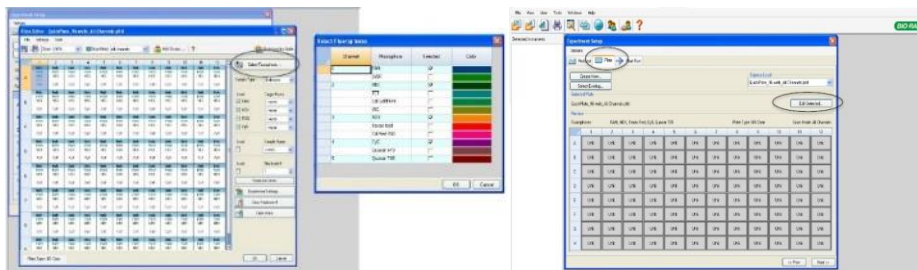
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на CFX96

| № | Температурно-временной режим        | Число циклов |
|---|-------------------------------------|--------------|
| 1 | 95°C – 6 мин                        | 1            |
| 2 | 95°C – 20 сек                       | 5            |
|   | 60°C – 20 сек                       |              |
|   | 72°C – 20 сек                       |              |
| 3 | 95°C – 10 сек                       | 35           |
|   | 60°C – 20 с, детекция HEX; FAM; ROX |              |
|   | 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**, **HEX**, **ROX** 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.



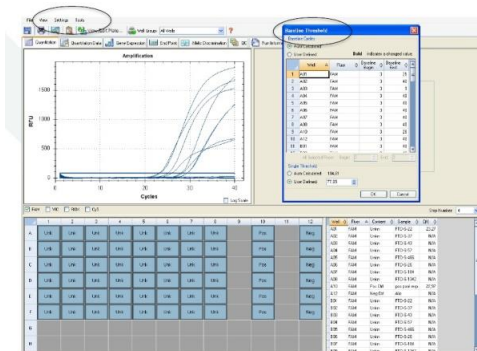
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛСИН-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 **Ct**.

## Анализ результатов амплификации для канала HEX (ДНК *Mycoplasma gallisepticum*).

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 «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

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

*Анализ результатов канала ROX (ДНК *Mycoplasma synoviae*) выполняют аналогично каналу HEX.*

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 5. Лист вносимых изменений

| Редакция                 | Место вносимых изменений                                                  | Суть вносимых изменений                                                                                                |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Версия 1.1 от 10.01.2018 | Раздел «Приложения» Инструкции                                            | Добавлено Приложение 3 «Порядок работы на приборе LightCycler® 96»                                                     |
| Версия 1.2 от 06.02.2020 | Раздел «Приложения» Инструкции                                            | Добавлено Приложение 4 «Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)»                                                |
| Версия 1.3 от 25.05.2021 | стр. 5, стр. 9                                                            | Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду      |
| Версия 1.4 от 21.07.2021 | п. 8. Интерпретация результатов анализа                                   | Отредактирован принцип интерпретации результата ПЦР – изменены значения, при которых результат считается положительным |
| Версия 1.5 от 12.11.2021 | По тексту                                                                 | Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды.<br><br>Изменения по тексту                            |
| Версия 1.6 от 10.01.2022 | По тексту                                                                 | Изменено название ВКО                                                                                                  |
| Версия 1.7 от 21.02.2022 | Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб | Отредактированы рекомендации по пробоподготовке                                                                        |

| Редакция                 | Место вносимых изменений                                                  | Суть вносимых изменений                                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Версия 1.8 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 1.9 от 28.09.2022 | Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)    | Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Сt                             |
|                          |                                                                           |                                                                                                 |
|                          |                                                                           |                                                                                                 |
|                          |                                                                           |                                                                                                 |
|                          |                                                                           |                                                                                                 |
|                          |                                                                           |                                                                                                 |

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ГАЛ/СИН-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](mailto:vet@faktor.ru)