



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР» для выявления РНК вируса болезни Ньюкасла (Newcastle disease virus) в биологическом материале от животных методом реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ ПЦР РВ)

ТУ 21.10.60-354-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение	4
2. Характеристика набора	4
3. Аналитические характеристики	6
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы и оборудование	7
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	8
7. Проведение анализа	9
8. Интерпретация результатов анализа	11
9. Условия транспортирования	12
10. Условия хранения	13
11. Срок годности	13
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. Порядок работы на приборе LightCycler® 96	23
Приложение 6. Лист вносимых изменений	30

Список сокращений

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

1. Назначение

Набор реагентов предназначен для выявления РНК вируса Ньюкасла (Newcastle disease virus) в биологическом материале¹ (смывы с гортани и конъюнктивы, соскобы с поверхности легких, сыворотка крови, помет, фрагменты тканей и органов (легкие, трахея, селезенка и др.)), в различной продукции птицеводства (мясо, пищевые продукты и полуфабрикаты, яйца (в т. ч. инкубационные)), а также в 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 ошибок 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 Ньюкасла (Newcastle disease virus) и генома внутреннего положительного контроля (бактериофага MS2) в мультиплексной полимеразной цепной реакции.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ОТ-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.

¹ Разрешается исследование биоматериала от всех восприимчивых видов птиц

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 NDV	прозрачная бесцветная жидкость*	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР NDV	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)²	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО NDV	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

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

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении НК других микроорганизмов: вирусов инфекционной анемии лошадей, гриппа, парагриппа 3 типа, ротавируса, бактерий *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma spp.*, *Leptospira interrogans*.

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

4. Меры предосторожности

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

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также рабочие реагенты и расходные материалы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одной зоны в другую.

Процесс исследования является строго однонаправленным, 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.

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 -24 до -18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология; «CFX96», Biorad 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).
- 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);
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от -24 до -18 °С;
- 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:

- Смывы с гортани и конъюнктивы, соскобы с поверхности легких. Зонд с материалом помещают для транспортировки в пробирки со стерильным физиологическим раствором (конец отламывают, что бы пробирку можно было закрыть).
- Помет весом 5 г отбирают в стерильный пластиковый контейнер;
- Сыворотка крови. Для получения сыворотки забирают кровь в пробирку без антикоагулянта;
- Фрагменты внутренних органов и тканей (трахея, легкие, селезенка, мозг, воздухоносные мешки, кишечник, лимфоузлы), образцы пищевой продукции и полуфабрикатов (в т.ч., мясо, котлеты и т.д.) помещают в стерильный контейнер.
- Куриные эмбрионы, инкубационные яйца.
- Культуры микроорганизмов в жидких средах отбирают в стерильную тару.
- Бактериальные колонии ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора.
- Питательные среды отбирают в стерильную тару (твердые ресуспендируют в физиологическом растворе).
- Смывы с поверхностей (внутрилабораторных, с поверхностей тары, кормушек, мест содержания животных и др.) отбирают в стерильную тару с 0,5 мл физиологического раствора.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре 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.

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

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемых проб

Смывы с гортани и конъюнктивы, соскобы с поверхности легких, 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 сыворотки пробирки с кровью (без антикоагулянта) отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 600–1600 g (3000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

При исследовании яиц тщательно смешивают желток и белок, берут 300 мкл и добавляют 200 мкл ОКО³, снова тщательно перемешивают. 100 мкл полученного материала используют в выделение. 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 аллантаической жидкости, используют 100 мкл в выделение.

Из тканей и органов, пищевой продукции и полуфабрикатов вырезают небольшие кусочки до 1 г весом. Растирают пробы в отдельных фарфоровых ступках или гомогенизируют на автоматических гомогенизаторах. Затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5-10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции РНК.

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

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Анализ с помощью набора реагентов «ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР» методом ОТ-ПЦР РВ состоит из трех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение реакции ОТ-ПЦР РВ;
- учет результатов анализа.

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

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, 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 **ОКО³ (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 70°C.

7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР

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

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО NDV, ВКО М1 и РНК БУФЕР**.

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:

- **10 мкл ПЦР БУФЕР NDV**
- **5 мкл ПЦР СМЕСЬ NDV**
- **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 NDV**.

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

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

7.3 Проведение 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 табл. 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа

Проба	Канал детекции		Результат
	JOE(HEX)/ Yellow	Cy5/Red	
	NDV	ВКО	
пКО K+	До 31	до 31	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
РНК бифер K-	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

Проба	Канал детекции		Результат
	JOE(HEX)/Yellow	Cy5/Red	
	NDV	BKO	
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. РНК вируса болезни Ньюкасла обнаружена
	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 **JOE(HEX)/Yellow** 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 **JOE(HEX)/Yellow** **более 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-НЬЮКАСЛА-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-НЬЮКАСЛА-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 -18 до -20°C;

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

11. Срок годности

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

Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций

Количество реакций	Объем `ПЦР БУФЕР NDV`, мкл	Объем `ПЦР СМЕСЬ NDV`, 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
99	990	495	74,3

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

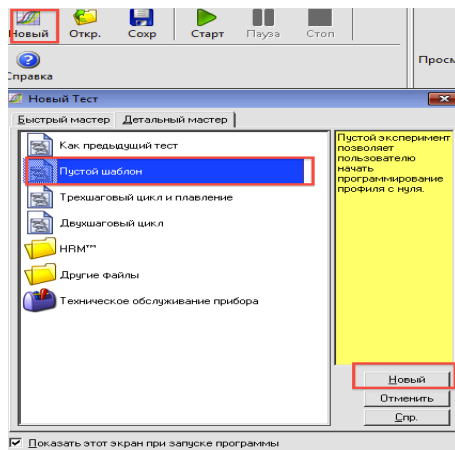
В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

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.

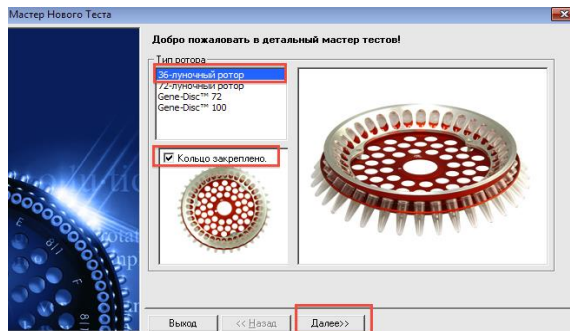
Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» 3000 / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» 6000 (Q)/ для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» 6000 (Q).

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

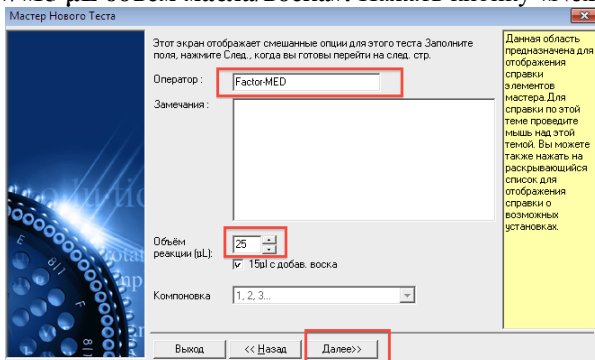
2. Выбрать в основном меню программы значок «New»/«Новый В открывшемся окне выбрать «Пустой шаблон», нажать кнопку «New»/«Новый



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 μ L oil layer volume**»/«**15 μ L 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 со следующими параметрами, указанными в таблице 4.

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

№ п/п	Температурно-временной режим Rotor-Gene	Число циклов
1	55°C – 15 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция JOE/Yellow; Cy5/Red	
	72 °C– 20 сек	

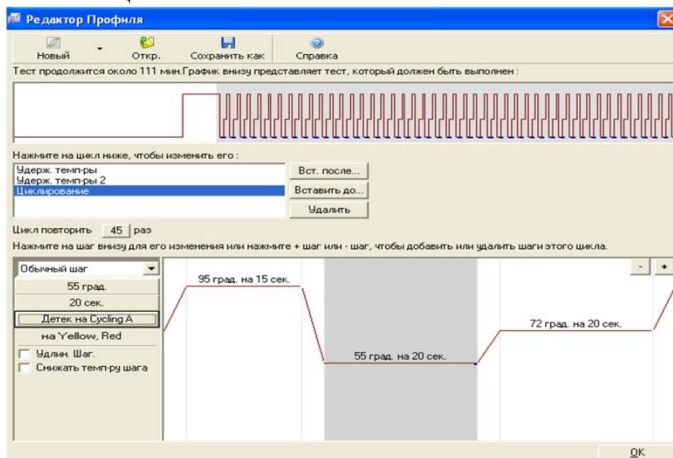
Нажать клавишу «**OK**».

Для этого требуется проделать следующие шаги:

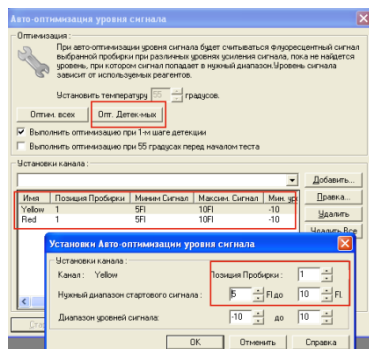
-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры», установить температуру 55°C и время 15 мин ;

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

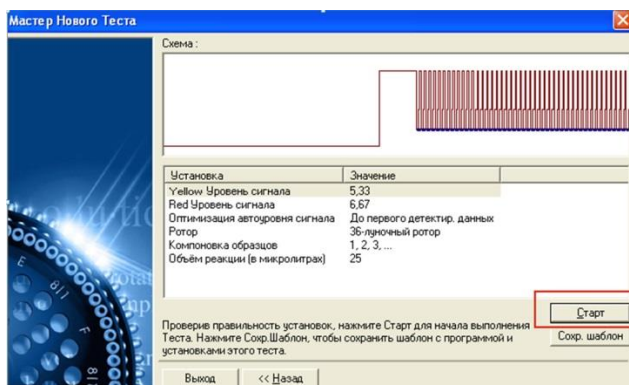
-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New cycling»/«Новое циклирование», установить параметры циклирования в соответствии с таблицей 4.



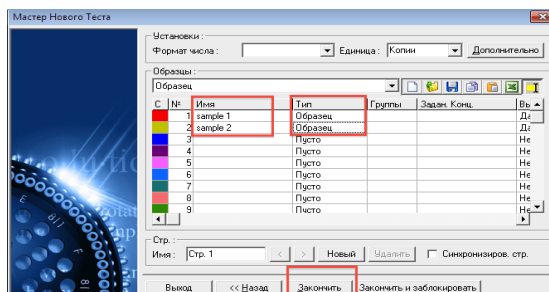
6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «Calibrate/Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.». В открывшемся окне нажать кнопку «Опт.детек-мых». Для обоих каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading** /минимальный сигнал - 5, **Max Reading** /максимальный сигнал — 10. 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 **Unkown «Образец»**.



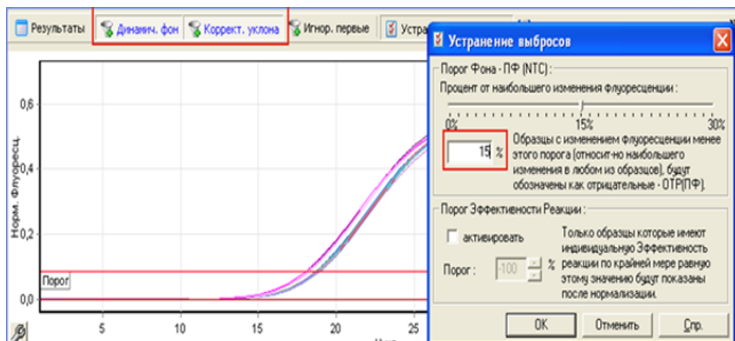
9. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

Анализ результатов амплификации для канала JOE(HEX)/Yellow

10. Нажать в меню кнопку «**Analysis**»/«**Анализ**», выбрать режим анализа «**Quantitation**»/«**Количественный**», нажать кнопку «**Cycling A. JOE(HEX)**»/«**Cycling A. Yellow**», 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**» - 15⁴%.



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

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

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

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**» - 10⁵%.

⁴ 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.

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

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

Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием **«ПЦР-НЬЮКАСЛА-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-НЬЮКАСЛА-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 – Нех, Су5

Создать программу амплификации **«ПЦР-НЬЮКАСЛА-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 в таблице 5:

⁵ Если для отрицательного контроля этапа ПЦР К- на канале Су5/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.

Таблица №5 Температурно-временной режим амплификации на ДТ-96

№ п/п	Температурно-временной режим ДТ-96	Число циклов
1	55°C – 15 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция Нех, Су5	
	72 °C– 20 сек	

Детекцию осуществлять после стадии отжиг. Нажмите **«ОК»** и сохраните программу под именем **«ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР»**. При дальнейшей работе использовать созданную программу.

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

9. В разделе **«1. Образцы»** ввести 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»**.

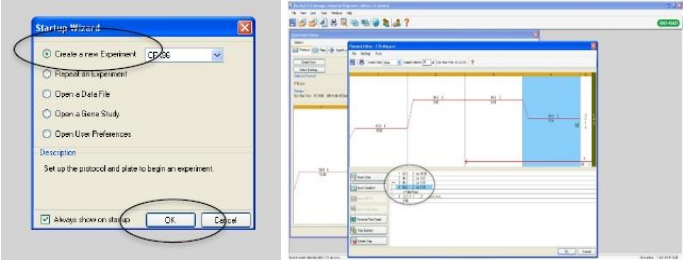
14. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку . В верхней части окна нажать клавишу **«Печать»** или **«Сохранить»**, выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее **«Рабочий стол»** → **«ПЦР-НЬЮКАСЛА-ФАКТОР»** → **«Отчеты»** → **«Год»** → **«Месяц»**, в поле **«Имя 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...**).



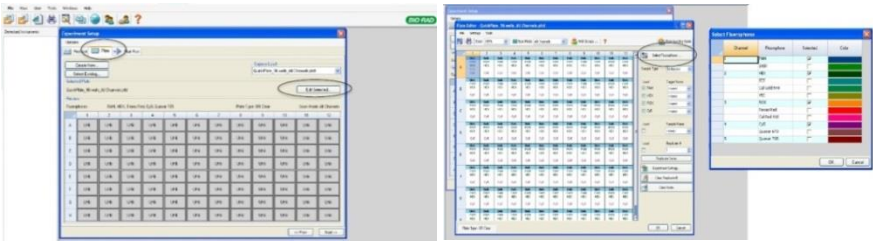
- 3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии с данными из таблицы 6:

Таблица №6 Температурно-временной режим амплификации на CFX96

№ п/п	Температурно-временной режим CFX96	Число циклов
1	55°C – 15 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция Hex, Cy5	
	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 **Hex** 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.



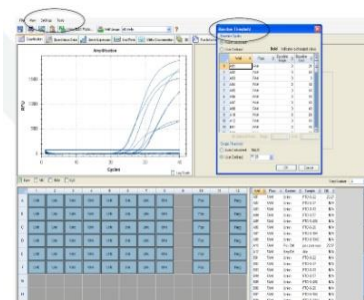
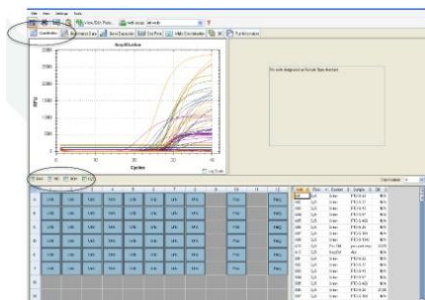
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-НЬЮКАСЛА-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 для канала Hex (РНК вируса болезни Ньюкасла)

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



8. 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 появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации для канала Cy5 (ВКО).

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 «К+» в

последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой).

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

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

11. В таблице результатов появятся значения Ct.

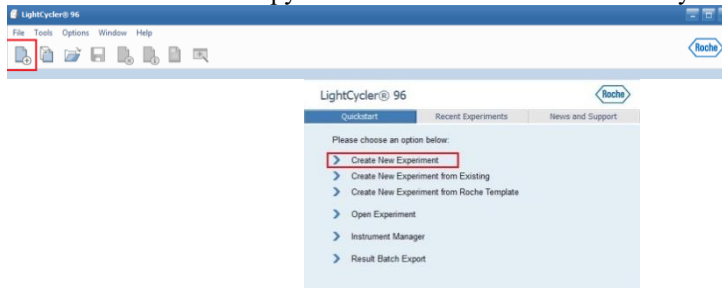
Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 5. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

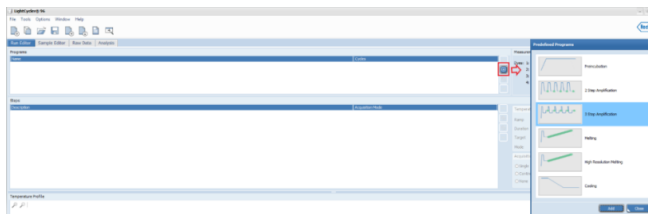
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

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 еще одну стадию Preincubation и стадию 3 step Amplification, после чего закройте окно Predefined Programs.

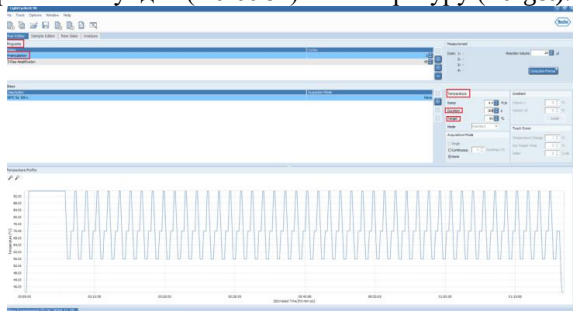


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 7.

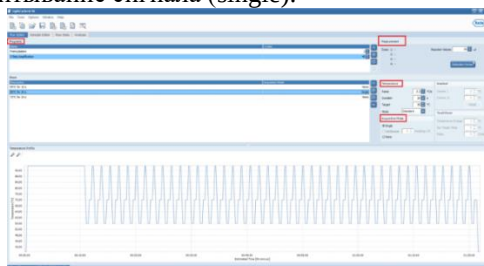
Таблица 7. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	55°C – 900 сек	1
2	95°C – 300 сек	1
3	95°C – 15 сек	45
	55°C – 20 сек, детекция Hex, Cy5	
	72 °C– 20 сек	

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



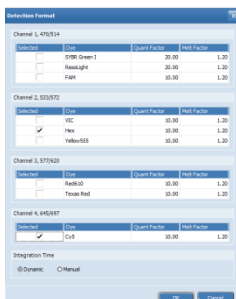
Далее в левой верхней части окна в разделе Programs выберите 3 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. В разделе Acquisition Mode на нужной стадии необходимо указать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



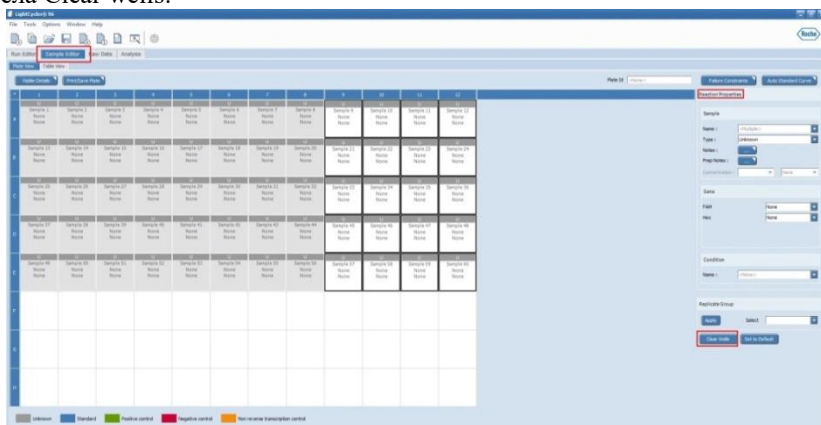
В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

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

Под Reaction Volume нажмите вкладку  и отметьте флуорофоры Hex и Cy5.



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



В окне Gene задайте наименования мишеней: Cy5 – VKO, Hex - NDV

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 BK- (ОКО)).

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

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

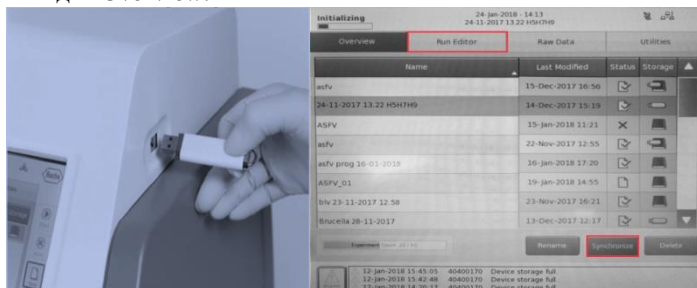


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler® 96 (.lc96)

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

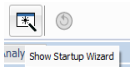
6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя

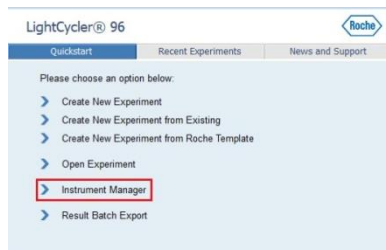
Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB  появится на панели состояния программы прибора LightCycler® 96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке *Overview*.



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

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

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



В поле *Instrument* должен отобразиться прибор *LightCycler*. Затем перейдите на вкладку *Send/Receive Experiment* и в окне *You PC* выберите сохраненный эксперимент и нажмите . Эксперимент будет скопирован в память прибора. Дальнейший запуск программы необходимо производить с помощью сенсорной панели на самом приборе LightCycler® 96.

7. Запуск эксперимента

Эксперимент запускается с помощью сенсорного управления на передней части прибора.

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

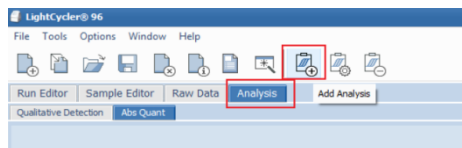


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

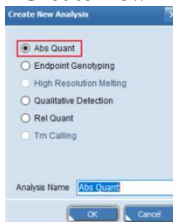
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

9. Анализ и интерпретация результатов

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

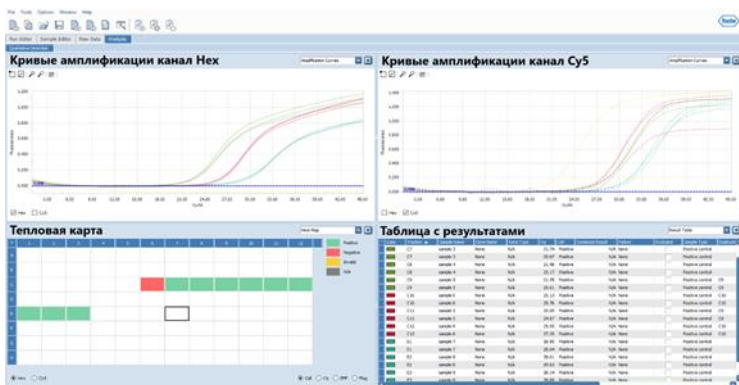


Откроется диалоговое окно *Create New Analysis*. Выберите *Abs Quant*



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

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



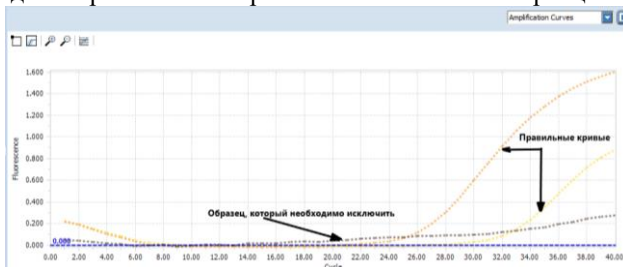
На тепловой карте (левое нижнее окно на рисунке) зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.

Внимание! Необходимо визуально оценить кривые амплификации как в сыром виде (вкладка *Raw Date*), так и после анализа (вкладка *Analysis*). Кривые должны иметь классическую s-образную форму. Образцы, форма которых не

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

соответствует классической и для которых на канале Cy5(ВКО) наблюдается корректный результат необходимо исключить и считать отрицательными

Для образцов, форма которых не соответствует классической и для которых на канале Cy5 (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 6. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 16.02.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 5 «Порядок работы на приборе LightCycler® 96»
Версия 1.2 от 22.11.2019	п. 8. «Интерпретация результатов анализа», Раздел «Приложения» Инструкции	Канал детекции Fam/Green изменен на канал детекции Joe(Hex)/Yellow
Версия 1.3 от 01.06.2021	Стр. 5, стр. 10	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается можно заменить физраствором, ТЕ-буфером, дистиллированной водой
Версия 1.4 от 07.06.2021	Стр. 4	Добавлена сноска, поясняющая, что можно исследовать яйца любых птиц
Версия 1.5 от 21.07.2021	Раздел «Приложения» Инструкции	Заменена часть изображений
Версия 1.6 от 18.11.2021	По тексту	Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды. Изменения по тексту
Версия 1.7 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.8 от 22.02.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке образцов

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.9 от 28.04.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала
Версия 1.10 от 29.09.2022	Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Сt)
Версия 1.11 от 18.10.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб По тексту	Добавлен материал для исследования: продукция птицеводства, в т.ч. пищевая продукция и полуфабрикаты

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-НЬЮКАСЛА-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