

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИИ *LAWSONIA INTRACELLULARIS* (*L.intra*) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (РВ-ПЦР)

РВ-ПЦР- *L.intra* (полный комплект на 50 реакций)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор – «РВ-ПЦР-*L.intra*» – предназначен для количественного определения ДНК бактерии *Lawsonia intracellularis* в образцах цельной крови, в продуктах питания свиного происхождения, а также в образцах патологического материала методом последовательной амплификации синтезированных фрагментов ДНК *Lawsonia intracellularis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «РВ-ПЦР-*L.intra*» может быть использован в лабораторной диагностике бактериальных инфекций, эпизоотическом надзоре и научных исследованиях.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода основан на использовании Полимеразной Цепной Реакции, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации двуцепочечной молекулы ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров HS-Taq полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается применением «Hot-Start» Tag-полимеразы, которая исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при раскапывании и начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления 5' концевой метки.

Исследование с использованием набора реагентов «РВ-ПЦР-*L.intra*» состоит из следующих двух этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация полученной ДНК *Lawsonia intracellularis* в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой ДНК, включена флуоресцентная метка **HEX**. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего/внешнего контрольного образца (ДНК ВКО), входит флуоресцентный краситель **FAM**. (Таблица. 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Набор реагентов «РВ-ПЦР-*L.intra*» включает образец-стандарт ДНК *Lawsonia intracellularis* в концентрациях:

L.intra СТ2 днк : 2×10^7 - 5×10^6 копий/мл и дополнительно (по заказу) *L.intra* СТ1 днк : 2×10^4 - 7×10^3 копий/мл

Таблица. 1. Каналы детекции продуктов амплификации.

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ДНК ВКО	<i>L.intra</i>	-	-	-

2.3. Набор включает 1 комплект реагентов - для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени. **В состав набора входят:**

✓ **Стандарты** включают:

- *L.intra* СТ2 ДНК (2×10^7 - 5×10^6 копий/мл) – 1 пробирка – по **100** мкл – **красная** крышка;
- Отрицательный Контрольный образец (КО-) – 1 пробирка – по **100** мкл – **зеленая** крышка;

✓ **Комплект реагентов для ПЦР-амплификации** включает:

- Смесь для амплификации «**Микс L.intra** ПЦР» – 1 пробирка (**850** мкл) – **желтая** крышка.

2.4. Время проведения анализа – приблизительно **1 час 20 минут**. + **20 минут** на Экстракцию ДНК.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В образцах, содержащих ДНК бактерии *Lawsonia intracellularis*, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих ДНК бактерии *Lawsonia intracellularis*, результат исследования должен быть отрицательным.

Чувствительность анализа: не менее 1 х 1000 копий на 1,0 мл цельной крови или 1 гр исследуемого материала.

Линейный диапазон концентраций ДНК бактерии *Lawsonia intracellularis*, определяемых детектирующим амплификатором, составляет 1×10^3 — 1×10^{12} копий/мл образца. Коэффициент вариаций результатов определений – не более 7%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Зона 1: Постановка ПЦР-реакции:

- ✓ Амплификатор детектирующий (RotorGene и BioRad);
- ✓ Центрифуга с ускорением не менее 13000 g;
- ✓ Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40–95 °С;
- ✓ Микроцентрифуга/вортекс;
- ✓ Холодильник бытовой с морозильной камерой;
- ✓ Пробирки типа Эппендорф одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- ✓ Штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл, 0,2 мл;
- ✓ Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- ✓ Одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- ✓ Одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ✓ Контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Материалом для исследования служат: цельная кровь/плазма/ликвор, мазки и смывы носа/зева/слюны, пат материал (куски тканей павших животных) и продукты питания свиного происхождения, а также фекалии и секционный материал:

- **Цельная Кровь/Плазма/Ликвор:**

- ✓ Для выделения следует брать **150 – 200** мкл цельной крови/сыворотки/плазмы. **Опционально:** При выделении из крови/сыворотки/ликвора можно использовать **ДНК ВКО**, особенно если материал мог быть подпорчен, поскольку в жидкой среде априори содержится меньше клеток, чем в тканях и мазках.

Взятие образцов периферической крови: Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта, потому что этот реагент ингибирует ПЦР реакцию.

- **Смывы/Мазки из ушей, полости носа, ротоглотки, зева и слюны:**

- ✓ Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа, затем опускают вниз и вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.
- ✓ После забора зонд помещают в сухую стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл «Транспортной среды» любого производителя или же 800 мкл обычного физ. раствора. Отрезать ватный тампон от зонда и поместить в подготовленную среду, после этого сразу заморозить. На исследование следует брать **150-200** мкл среды, предварительно как следует перемешав ее на вортексе или тщательным пипетированием.

- **Фекалии/Секционный материал:**

- ✓ Фекалии.
Используют пробы фекалий массой (объемом) 1-2 г (1-2 мл). Пробу в количестве 1 грамма (примерно) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон. Перед проведением Экстракции пробу растворяют в 1 мл физ. раствора и после тщательного перемешивания на исследование берут **150-200** мкл.
- ✓ Секционный материал
Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия либо исследуют в течении 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течении 1 года при температуре не выше минус 68°С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. На исследование брать **150-200** мкл.

- **Патологический материал и продукты питания**

- ✓ На выделение берут соскобы с поверхности тканей в объеме **1 – 2** спичечных головок (**0,05 – 0,1** гр или **50 – 100** мкг). Соскоб можно поместить непосредственно в **Лизирующий Раствор**.
- ✓ Или взять **1** гр пат материала или готового продукта свиного происхождения и добавить **5** мл обычного физ. раствора или дистиллята, тщательно гомогенизировать в фарфоровой ступке. После, отобрать **150 – 200** мкл полученного Гомогената и поместить в **Лизирующий Раствор**.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Экстракцию ДНК из клинического материала можно проводить практически любыми наборами, предназначенными для выделения/экстракции нуклеиновых кислот из биологических образцов. Однако, считаем нужным предупредить !!!, что наборы разных производителей могут довольно сильно отличаться друг от друга. Мы отработывали некоторые из них и можем с уверенностью заявить, что ПЦР-набор «РВ-ПЦР-*L.intra*» полностью совместим с наборами для выделения следующих производителей:

- **Интерлаб Сервис** – «ДНК-сорб-В»; «РИБО-сорб» и «РИБО-преп»
- **Вет Фактор** – «ДНК/РНК-С-фактор»; «ДНК-С-фактор»

Или же с набором компании ВМТ:

- **ВМТ** – «ДНК-СиликаСпин-Преп»

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЙ ЭТАПА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК (ВМТ – «РНК/ДНК-СиликаСпин-Преп»)

- 1 Раствор для лизиса – **Раствор I** (если хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре **65 °С** до полного растворения кристаллов.
- 2 Добавьте **500-600** мкл **Раствора I** к исследуемому материалу. Тщательно перемешайте на вортексе.
- 3 Инкубируйте микропробирки со смесью **10-15** минут при комнатной температуре. Если смесь лизировалась не полностью (Материала было слишком много !!! например из кусочков тканей), то пробирку нужно центрифугировать **5** минут (~ **12-13 000** об/мин).
- 4 Перенесите **800** мкл смеси **лизата** в чистую подписанную **Спин-колонку** (Входит в комплект набора «РНК/ДНК-СиликаСпин-Преп») или же добавьте к ней **25-30** мкл **Сорбента** (Входит в комплект набора «РНК/ДНК-Силика-Преп»). Проведите центрифугирование в течение **1-2** минуты на макс. оборотах. Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки.
- 5 Одним носиком добавьте в каждую спин-колонку по **400** мкл **Раствора II**. Центрифугировать в течение **1-2** минуты (~ **10-12 000** об/мин). Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки.
- 6 Одним носиком добавьте в каждую спин-колонку по **500** мкл **Раствора III**. Центрифугировать в течение **1-2** минуты (~ **10-12 000** об/мин). Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки.
- 7 Слейте/Удалите жидкость из собирающей пробирки. И проведите короткое центрифугирование еще раз для удаления остатков **Раствора IV**.
- 8 Добавьте в самый центр колонки по **70** мкл **Раствора V**. Инкубируйте **1** минуту при **NT** и центрифугируйте в течение **1-2** минуты (~ **10-12 000** об/мин).

Препарат ДНК довольно стабилен, но мы рекомендуем сразу же убрать пробы на +4 С или же на – 20 С для длительного хранения.

Теперь пробы ДНК бактерии *Lawsonia intracellularis* готовы к постановки ПЦР-реакции.

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции:

7.2.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок/лунок для исследуемых образцов, положительного калибровочного образца ДНК «СТ2» и отрицательного контрольного образца «КО». Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 20 пробирок/лунок для исследуемых образцов; 2 пробирки для «КО»; 2 пробирки для «СТ2». Общее количество пробирок получается – 24. В целях экономии времени и пространства можно исследовать пробы и контроли только в одной повторности.

НО !!! Мы не рекомендуем !!! Во избежание получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов !!!

7.2.2. Разморозьте при комнатной температуре (18–25 °С) «Микс *L.intra* ПЦР» из комплекта реагентов.

7.2.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс *L.intra* ПЦР» наконечником на 1000 мкл с фильтром 15-20 раз. Пройдитесь наконечником по внутренним стенкам пробирки несколько раз для того, чтобы смыть ПЦР-смесь с них. Раствор должен стать полностью однородный.

Не на вортесе !!! ВАЖНО !!! Ферменты подвергаются механическим повреждениям !!!

7.2.4. Приготовьте «Микс *L.intra* ПЦР».

Смешайте в отдельной пробирке:

- 15 × (N+1) мкл Микс *L.intra* ПЦР

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «КО» и «СТ2».

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 12. В двух повторностях – 24.

Можно разливать ПЦР-смесь прямо из пробирки «Микс *L.intra* ПЦР»

7.2.5. Аккуратно пипетируя, добавьте во все промаркированные пробирки/луночки по 15 мкл смеси «Микс *L.intra* ПЦР» наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.6. Встряхните пробирки с препаратом ДНК (можно на вортесе – 10-20 секунд) и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3 – 5 сек.

7.2.7. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите по 10 мкл полученного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки/луночки для исследуемых образцов (по 2 шт для каждого образца – в случае необходимости проведения исследования в двух повторностях) наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.8. Внесите по 10 мкл ДНК положительного стандарта «*L.intra* СТ2 ДНК» в пробирки/луночки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.9. Внесите по 10 мкл Отрицательного Контроля (КО⁻) в пробирки/луночки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.10. Центрифугируйте пробирки при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).

7.2.11. Установите все пробирки в блок/ротатор амплификатора детектирующего. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

8. УСТАНОВКА И ПРОГРАММИРОВАНИЕ АМПЛИФИКАТОРОВ, АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе RotorGene:

Поместить пробирки в ротор амплификатора Rotor-Gene (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

Программирование амплификатора:

Rotor-Gene 3000 – программа Rotor-Gene версии 6,

Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q – программа Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора **Rotor-Gene 3000** / для англоязычной версии программы **Rotor-Gene 6000 (Rotor-Gene Q)** / для русскоязычной версии программы **Rotor-Gene 6000**:

- ✓ Нажать кнопку *New/Новый* в основном меню программы.
- ✓ Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью *No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено*.
- ✓ Нажать кнопку *Next/Далее*.
- ✓ Выбрать объем реакционной смеси: *Reaction volume/Объем реакции - 25* мкл. Для RotorGene 6000 должно быть отмечено окошко *15 µL oil layer volume/15 мкл объем масла/воска*.
- ✓ Нажать кнопку *Next/Далее*.
- ✓ В верхней части окна нажать кнопку *Edit profile/Редактор профиля*.
- ✓ Задать следующие параметры эксперимента: Флуоресценцию измеряют при 55 °С на каналах **FAM/Green, HEX/Yellow**. Нажать дважды кнопку *OK/Да*.
- ✓ В нижней части окна нажать кнопку *Calibrate/Gain Optimisation/Onm.уровня сигн*. В открывшемся окне нажать кнопку *Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Onm. Детектируемых*, выбрать функцию: *Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции*. Для обоих каналов установить параметры *Min Reading/Миним. Сигнал* – 5F1 и *Max Reading/Максим. Сигнал* – 10F1. Окно закрыть, нажав кнопку *Close/Закреть*.
- ✓ Нажать кнопку *Next/Далее*, запустить амплификацию кнопкой *Start run/Старт*. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).
- ✓ В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку *Edit samples/Правка образцов* (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли обозначить как *Unknown/Образец*.

Таблица. 2. Температурный режим амплификации для приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	15	00	1		Цикл
2	95	0	10	42		Цикл
	60	0	20		✓	
3	10		Хранение

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM/Green):

- ✓ Нажать в меню кнопку *Analysis/Анализ*, выбрать режим анализа *Quantitation/Количественный*, нажать кнопку *Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать*.
- ✓ Отменить автоматический выбор *Threshold/Порог*.
- ✓ В меню основного окна *Quantitation analysis/Количественный анализ* должна быть активирована кнопка *Dynamic tube/Динамич.фон* и *Slope Correct/Коррек уклона*.
- ✓ В меню окна *More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов* установить значение *NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%*.
- ✓ 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/Лог.шкала*).
- ✓ В меню *CT Calculation/Вычисление СТ* (в правой части окна) выставить *Threshold/Порог = 0.05*.
- ✓ В таблице результатов (окно *Quant. Results/Количественные Результаты*) появятся значения *Сt*.

Анализ результатов амплификации специфического участка вирусного генома (канал HEX/Yellow):

- ✓ Нажать в меню кнопку *Analysis/Анализ*, выбрать режим анализа *Quantitation/Количественный*, нажать кнопку *Cycling A. HEX/Cycling A. Yellow, Show/Показать*.
- ✓ Отменить автоматический выбор *Threshold/Порог*.
- ✓ В меню основного окна *Quantitation analysis/Количественный анализ* должна быть активирована кнопка *Dynamic tube/Динамич.фон* и *Slope Correct/Коррек уклона*.
- ✓ 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/Лог.шкала*).
- ✓ В меню окна *More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов* установить значение *NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10%*.
- ✓ В меню *CT Calculation/Вычисление СТ* (в правой части окна) выставить *Threshold/Порог = 0.1*.
- ✓ В таблице результатов (окно *Quant. Results/Количественные Результаты*) появятся значения *Сt*.

8.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5, iCycler iQ и CFX96 (Bio-Rad, США)

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе BioRad:

Поместить пробирки в ротор амплификатора BioRad (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе).

Программирование амплификатора:

iCycler iQ – программа,

iCycler iQ5 – программа,

CFX96 – программа BioRad CFX Manager.

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала на приборе Bio-Rad:

- ✓ Для прибора iCycler iQ5 в окне *Selected Plate Setup* модуля *Workshop* нажать кнопку *Create New* или *Edit*. Редактировать схему планшета в режиме *Whole Plate loading*. В опции *Select and load Fluorophores* задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Задать объем реакции (*Sample Volume*) **25** мкл, тип крышек (*Seal Type*): *Domed Cap*, тип пробирок (*Vessel Type*): *Tubes*. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку *Save&Exit Plate Editing*. В окне *Selected Protocol* модуля *Workshop* нажать кнопку *Create New* или *Edit*. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку *Save&Exit Protocol Editing*. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке *Protocol* (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (*Selected Protocol*) и схемы планшета (*Selected Plate Setup*). Для запуска нажать кнопку *Run*. Выбрать для измерения факторов лунок вариант *Collect Well Factors from Experimental Plate*. Нажать кнопку *Begin Run*, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать *OK*.

- ✓ Для прибора *iCycler iQ* в окне *Edit Plate Setup* модуля *Workshop*, в опции *Samples: Whole Plate Loading* задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне *Sample Identifier*. В опции *Select and load Fluorophores* задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне *Plate Setup Filename* и нажав кнопку *Save this plate setup* (в верхней части экрана). Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку *Run with selected protocol*.

Выбрать опцию *Edit Protocol* модуля *Workshop*. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: *Cycle 3 – Step 2*. Сохранить протокол, задав имя файла в окне *Protocol Filename* (ASFV.tmo) и нажав кнопку *Save this protocol* (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке *View Protocol* в модуле *Library*. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку *Run with selected plate setup*.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Перед запуском выполнения программы в окне *Run Prep* следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант *Experimental Plate* в меню *Select well factor source*. Задать объем реакционной смеси в окне *Sample Volume – 25 мкл*. Для запуска нажать кнопку *Begin Run*, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать *OK*.

- ✓ Для прибора *CFX96* в стартовом окне открыть *Create New Run* (или в меню *File* выбрать *New* и далее *Run*). В окне *Run Setup* выбрать *Protocol* и нажать *Create New ...* В появившемся окне *Protocol Editor – New* задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси *Sample Volume – 25 мкл*. В окне *Plate* модуля *Experiment Setup* задать схему расположения планшета (пробирок), а также выставить нужные для эксперимента каналы для флуорофоров. Если набор выявляет один микроорганизм, то в меню *Sample Type* и выбрать *Unknown*, нажав на кнопку *Select Fluorophores ...*, затем указать галочками флуорофоры **FAM** и **HEX** и нажать *OK*. После этого, галочками задать измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне *Sample Name* задать название образцов. Сохранить. Открыть крышку прибора, нажав *Open Lid* и поставить пробирки в соответствующие ячейки, закрыть крышку *Close Lid*. Запустить прибор *Start Run*.

Таблица. 3. Температурный режим амплификации для амплификаторов *iCycler iQ5*, *iCycler iQ* и *CFX96*

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	15	00	1		Цикл
2	95	0	10	42		Цикл
	60	0	20		✓	
3	10		Хранение

Анализ результатов амплификации специфического участка вирусного генома (канал Hex):

Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:

- ✓ Для прибора *iCycler iQ5* выбрать нужный файл с данными анализа в окне *Data File* модуля *Workshop* и нажать кнопку *Analyze*. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку *Results (iCycler iQ5)*. Дальнейший учет результатов проводят, используя полученные значения *Ct*.
- ✓ Для прибора *iCycler iQ* в модуле *Library* активировать окно *View Post-Run Data*. В окне *Data Files* выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку *Analyze Data*. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку *PCR Quant (iCycler iQ)*. Дальнейший учет результатов проводят, используя полученные значения *Ct*.

- ✓ Для прибора CFX96 в окне модуля *Data Analysis* во вкладке *Quantitation* выбрать данные по каналу HEX, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Чтобы установить уровень пороговой линии, необходимо либо перетащить ее с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню *Baseline Threshold* (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию *User Defined* и внести нужное значение в текстовое поле. Анализ результатов амплификации ВКО, регистрируемых по каналу FAM проводится аналогичным образом.
ПРИМЕЧАНИЕ: Анализ результатов проводится по каналам FAM и HEX. Результаты обрабатывают для каждого канала по-отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора. Пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Эффективность амплификации должна составлять 90–130%.
- Результаты реакции для отрицательного контрольного образца и положительного стандарта должны соответствовать представленным в таблице 4.

Отрицательный контроль – не определяется.

Геномная ДНК свиньи в качестве Внутреннего Контроля амплификации детектируются по каналу FAM.

Геномная ДНК бактерии *Lawsonia intracellularis*, а также Положительный Контрольный Образец CT2 детектируются по каналу HEX:

«*L.intra* CT2 ДНК» — (2×10^7 - 5×10^6 копий/мл).

Таблица. 4. Интерпретация результатов контрольных образцов

Стандарты	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу HEX
Отрицательный Контроль	Не определяется	Не определяется
<i>L.intra</i> CT2 ДНК	Не определяется	23 — 25
ДНК ВКО	20 — 22	Не определяется

ВНИМАНИЕ: Значения Ct для обоих стандартов могут отличаться от партии к партии !!!

- Интерпретация результатов амплификации испытуемых образцов может проводиться в двух режимах: качественном и количественном. Оценку результатов в качественном формате проводят в соответствии с **Таблицей 5** на странице номер 9.

Опционально: для количественной оценки результатов в набор можно положить дополнительный положительный калибровочный образец:

«*L.intra* CT1 ДНК» — (2×10^4 - 7×10^3 копий/мл). Значения Ct для данного стандарта включены в прилагаемой расчетной табличке формата Excel.

Стандарты	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу HEX
<i>L.intra</i> CT1 ДНК	Не определяется	33 — 35

Таблица. 5. Интерпретация результатов в качественном формате

Ct по каналу HEX Ct по каналу FAM	Ct < Ct2 Результат Положительный	Ct2 < Ct < Ct = 34 Результат Положительный	Ct = 34 < Ct < Ct = 36 Результат Сомнительный	Ct > Ct = 37 Результат Отрицательный
Ct < 33 Выделение образца прошло успешно	ДНК вируса обнаружена Вирусных частиц более 10 ⁸ копий/мл. Заражение очень сильное.	ДНК вируса обнаружена Вирусных частиц менее 10 ⁸ копий/мл. Заражение сильное/среднее	1. Может свидетельствовать о присутствии вялотекущей инфекции, или же о возможно недавно перенесенном заболевании 2. Может свидетельствовать о наличии вакцинного штамма в пробе, или же хронической инфекции	ДНК вируса не обнаружена Проба считается отрицательной
Ct > 33	Ct > Ct = 36, то Не прошло выделение образца или же использовался образец с деградировавшим материалом			

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.
- Комплект реагентов для ПЦР-амплификации, стандарты и отрицательный контроль следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение стандартов и отрицательного контроля при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается многократное замораживание-оттаивание «Микс ПЦР» не более 5-7 раз.
- Транспортировку набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- Допускается кратковременное хранение при 2-10 °С не более 10-15 суток.
- Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.
- Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

11. СЛУЖБА ТЕХНИЧЕСКОЙ ПОДДЕРЖКИ

В случае появления вопросов обращайтесь в службу технической поддержки: dvlleman@gmail.com, а также по телефону: +7 977 516 86 53.