

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА КУР (ИЛТ) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (РВ-ПЦР)

РВ-ПЦР-ИЛТ (полный комплект на 50 реакций)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор – «РВ-ПЦР-ИЛТ» – предназначен для количественного определения РНК вируса Инфекционного Ларинготрахеита Кур (ИЛТ) в образцах фекалий, смывов/мазков из носоглотки, ушей и зоба, а также в образцах патологического материала методом последовательной амплификации синтезированных фрагментов ДНК вируса ИЛТ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «РВ-ПЦР-ИЛТ» может быть использован в лабораторной диагностике вирусных инфекций, эпизоотическом надзоре и научных исследованиях.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода основан на использовании методов Обратной Транскрипции и Полимеразной Цепной Реакции, заключающиеся в непродолжительной температурной инкубации с ферментом Обратной Реввертазой и 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-ИЛТ» состоит из следующих двух этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация полученной геномной ДНК ИЛТ в режиме реального времени.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой РНК, включена флуоресцентная метка **HEX**. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контроля (геном курицы), 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-ИЛТ» включает образец стандарта геномной ДНК вируса ИЛТ.

Таблица. 1. Каналы детекции продуктов амплификации.

Fam	HEX/VIC/R6G
ВКО Геном Курицы	ИББ Геном Вируса

2.2. Набор включает 1 комплект реагентов - для постановки Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

В состав набора входят:

- ✓ Калибровочные образцы (Стандарты) включают :
 - ИЛТ СТ2 днк – 1 пробирка (100 мкл) – красная крышка;
 - Отрицательный контроль (КО⁻) – 1 пробирка (100 мкл) – зеленая крышка.
- ✓ Комплект реагентов для ОТ-реакции и ПЦР-амплификации включает :
 - Смесь для амплификации «Микс ИЛТ пцр» – 1 пробирка (850 мкл) – желтая крышка;

2.4. Время проведения анализа – приблизительно 1,20 часа. + 20-30 минут на Экстракцию РНК.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В образцах, содержащих ДНК вируса ИЛТ, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих ДНК вируса ИЛТ, результат исследования должен быть отрицательным.

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

Линейный диапазон концентраций ДНК вируса ИЛТ, 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: мазки и смывы носоглотки/зева/слюны, пат материал (куски тканей), а также фекалии :

- **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 **200-250** мкл среды, предварительно как следует перемешав ее на вортексе или тщательным пипетированием.

- **Фекалии :**

- ✓ 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.

- **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-ИЛТ»** полностью совместим с наборами для выделения следующих производителей:

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

Или же с набором компании ВМТ:

- **ВМТ – «РНК-СиликаСпин-Преп»**

Теперь пробы **ДНК вируса ИЛТ** готовы к постановке **ПЦР-амплификации**.

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 10 пробирок/лунок для исследуемых образцов; 1 пробирку для «КО»; 1 пробирку для положительного стандарта «СТ2». Общее количество пробирок получается – 12.

7.2.2. Разморозьте при комнатной температуре (18–25 °С) «Микс ИЛТ пцр» из комплекта реагентов.

7.2.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс ИЛТ 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 вортексе !!! ВАЖНО !!! Ферменты подвергаются механическим повреждениям !!!

7.2.4. Подготовьте «Микс ИЛТ пцр».

Смесь можно разливать прямо из пробирки «Микс ИЛТ пцр» !!! Все необходимые реагенты, включая фермент – Полимераза – уже внутри !!!

7.2.5. Аккуратно пипетируя, добавьте во все промаркированные пробирки/луночки по **15 мкл** смеси «Микс ИЛТ 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** Отрицательного Контроля (**КО⁻**) в пробирки/луночки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.8. 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.

7.2.9. Внесите по **10 мкл** **ДНК** Положительного Стандарта «**ИЛТ СТ2 днк**» 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/ротор 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 (CorbettResearch, Австралия) и Rotor-GeneQ (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 **15µL 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 **60 °C** на каналах **FAM/Green, R6G/Yellow**. Нажать дважды кнопку **OK/Да**.
- ✓ В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт. Уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. 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** – 5FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 10FI. Окно закрыть, **Close/Заккрыть**.
- ✓ Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Startrun/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-GeneQ

№ стадии	Температура, °C	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	10	00	1		Инкубация
2	95	0	05	5		Цикл
	60	0	15			
3	95	0	05	42		Цикл
	60	0	15		✓ Детекция	

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 = 0.025**.
- ✓ 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= 0.03**.
- ✓ 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 CFX 96 (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, CFX 96 – 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 **HEX**. 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 **HEX**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup File name** 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 File name** (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 iCycleriQ5, iCycleriQ и CFX96

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	5	00	1		Инкубация
2	95	0	05	5		Цикл
	60	0	15			
3	95	0	05	42		Цикл
	60	0	15		✓ Детекция	

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 **iCycleriQ** 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 (iCycleriQ)**. 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 **BKO**, 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.

8.3. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИБОРА ДТ-96 (Россия)

Подготовка к работе

- ✓ Откройте программу «Real-Time PCR» для прибора ДТ-96. В появившемся окне выберите **Работа с прибором**. В верхней части окна откройте вкладку **Тест** и **Создать/Редактировать тест**.
- ✓ Нажмите на кнопку **Создать новый тест** и введите имя нового теста, например **ИЛТ-ВМТ** : Нажмите **ОК**.
- ✓ Приведите открывшееся окно **Тест** к следующему виду:
 - активируйте красители **FAM** и **R6G**
 - создайте программу амплификации **ИЛТ-ВМТ**, нажав на иконку.
- ✓ В редакторе программ амплификации выберите шаблон и нажмите кнопку **Применить**.
- ✓ Используя инструкцию, введите программу амплификации:

№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	95	5	00	1		Инкубация
2	95	0	05	5		Цикл
	60	0	15			
3	95	0	05	44		Цикл
	60	0	15		✓ Детекция	

Нажмите **ОК** и сохраните программу под именем **ИЛТ-ВМТ**. При дальнейшей работе использовать созданный метод.


Проведение анализа

- ✓ Включите прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Запустите на компьютере программу **RealTime PCR** для прибора **ДТ-96**. В появившемся окне выберите **Работа с прибором** и **Добавить тест**. В окне добавления теста выберите **ИЛТ-ВМТ**.
- ✓ В разделе **1. Образцы** введите количество образцов, включая все контрольные образцы. В разделе **3. Контроли** поставьте нули и нажмите **ОК**. Пользуясь инструкцией к прибору заполните **Идентификатор пробирки** и **Тип**, обратите внимание на порядок заполнения. Нажмите кнопку **Применить**.
- ✓ Установить пробирки в реакционный блок согласно порядку заполнения и нажать кнопку **Запуск программы**. В появившемся окне набрать название протокола и **Сохранить**. После окончания реакции отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.

Расчет значений порогового цикла

- ✓ После завершения реакции можно сразу приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать **Просмотр архива**. Далее нажать на иконку с изображением папки и выбрать файл, в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа **Ct(Cp) для всех каналов**. Метод – **Геометрический (Cp)**. 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**.

- ✓ Для получения сводного отчета по протоколу нужно нажать необходимую кнопку . В верхней части окна нажать клавишу **Печать** или **Сохранить**, выбрать расширение файла, например ***.rtf MS Word**, далее **Рабочий стол** → **ИЛТ-ВМТ** → **Отчеты** → **Год** → **Месяц**, в поле **Имя файла** ввести название в форме **год. месяц. число-данные**. Нажать **Сохранить**. Нажать клавишу **Заккрыть**.
- ✓ Заккрыть или свернуть программу **RealTime PCR**.

Анализ результатов детекции ДНК ИЛТ

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 РНК в соответствии с **таблицей 4 и 5**.

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.

Геном кур/птиц в качестве Внутреннего Контроля амплификации детектируются по каналу **FAM**.

Геном вируса Инфекционного Ларинготрахеита Кур (ИЛТ), а также Положительный Контрольный Образец **СТ2** детектируется по каналу **HEX/VIC/R6G**.

Таблица. 4. Интерпретация результатов контрольных образцов

Стандарты	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу HEX
Отрицательный Контроль	Не определяется	Не определяется
ИЛТ СТ2 ДНК	Не определяется	20 – 25

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 11.

Таблица. 5. Интерпретация результатов в качественном формате

Ct по каналу HEX/VIC/R6G	Ct < 37	Ct > 37
Ct по каналу FAM	Результат Положительный	Результат Отрицательный
Ct < 33 Выделение образца прошло успешно	ДНК вируса обнаружена. Проба считается положительной.	ДНК вируса не обнаружена. Проба считается отрицательной.
Ct > 33	Ct > Ct = 37, 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**.