

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ РНК КОРОНАВИРУСА КОШЕК И СОБАК МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (РВ-ПЦР)

РВ-ПЦР-Coronavir f/d (полный комплект на 50 реакций)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор – «РВ-ПЦР-Coronavir f/d» – предназначен для количественного определения РНК Коронавируса кошек и собак в образцах цельной крови и фекалий методом последовательной амплификации синтезированных фрагментов кДНК вируса РКС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «РВ-ПЦР-Coronavir f/d» 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 кДНК, 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 кДНК-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-Coronavir f/d» состоит из следующих двух этапов: выделение РНК (пробоподготовка), Обратная Транскрипция и ПЦР-амплификация полученной кДНК Коронавируса кошек и собак в режиме реального времени.

В состав кДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой РНК, включена флуоресцентная метка **HEX**. В состав кДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации Внешнего Контрольного Образца (**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-Coronavir f/d» включает образец стандарта кДНК вируса Коронавируса кошек и собак.

Таблица. 1. Каналы детекции продуктов амплификации.

Fam	Hex/VIC/R6G
ВКО Внешний Контроль	Coronavir f/d Геном Вируса

2.2. Набор включает 1 комплект реагентов - для постановки Обратной Транскрипции (ОТ-реакция) и Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР-амплификация) в режиме реального времени.

В состав набора входят:

- ✓ **Калибровочные образцы (Стандарты)** включают :
 - **Coronavir f/d СТ кДНК** – 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 Coronavir f/d Отр**» – 1 пробирка (**850** мкл) – **желтая** крышка;
 - Внешний Контрольный Образец (**ВКО**) – 1 пробирка (**550** мкл) – **серая** крышка.

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В образцах, содержащих РНК Коронавируса кошек и собак, определяется концентрация вируса в исследуемом материале. В образцах, не содержащих РНК Коронавируса кошек и собак, 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 РНК Коронавируса кошек и собак, 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/сыворотка, мазки и смывы носоглотки/зева/слюны, пат материал (куски тканей), а также фекалии :

- **Цельная Кровь/Плазма/Ликвор :**

- ✓ Для выделения следует брать **150** мкл цельной крови/сыворотки/плазмы.
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, а также фекалии :**

- ✓ 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** мкл среды, предварительно как следует перемешав ее на вортексе или тщательным пипетированием.
- ✓ Для отбора фекалий 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 **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** мкл полученного Гомогената и поместить в **Лизирующий Раствор**.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Экстракцию **РНК** 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-Coronavir f/d»** 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-Силика-Преп»**

Теперь пробы **РНК Коронавируса кошек и собак** готовы к постановке **ОТ-реакции** и **ПЦР-амплификации**.

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции:

7.2.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок/лунок для исследуемых образцов, положительного калибровочного образца «СТ» 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 «СТ». Общее количество пробирок получается – 12.

7.2.2. Разморозьте при комнатной температуре (18–25 °С) «Микс **Coronavir f/d Отр**» из комплекта реагентов.

7.2.3. Аккуратно пипетируя, перемешайте пробирку со смесью «Микс **Coronavir f/d Отр**» 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 **Coronavir f/d Отр**».

Смесь можно разливать прямо из пробирки «Микс **Coronavir f/d Отр» !!! Все необходимые реагенты, включая ферменты – Ревертаза и Полимераза – уже внутри !!!**

7.2.5. Аккуратно пипетируя, добавьте во все промаркированные пробирки/лунки по **15 мкл** смеси «Микс **Coronavir f/d Отр**» наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.6. Встряхните пробирки с препаратом **РНК** (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 **РНК** открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты **РНК** следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите по **10 мкл** Отрицательного Контроля (**КО**) в пробирки/лунки наконечником на 20 мкл с фильтром.

7.2.8. Внесите по **10 мкл** полученного из образцов препарата **РНК** в соответствующие пробирки/лунки 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** **кДНК** Положительного Стандарта «**Coronavir f/d СТ кДНК**» в пробирки/лунки 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 °С на каналах **FAM/Green, HEX/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, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	52	20	0	1		Инкубация
2	95	10	00	1		Инкубация
3	95	0	05	4		Цикл
	57	0	20			
4	95	0	05	44		Цикл
	60	0	20		✓ 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 CT** (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 CT** (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 **iCycleriQ** 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, °C	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	52	25	0	1		Инкубация
2	95	5	00	1		Инкубация
3	95	0	05	4		Цикл
	58	0	20			
4	95	0	05	44		Цикл
	60	0	20		✓ 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 выберете **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 **Coronavir f/d-BMT** : Нажмите **OK**.
- ✓ Приведите открывшееся окно **Тест** к следующему виду:
 - активируйте красители **FAM** и **R6G**
 - создайте программу амплификации **Coronavir f/d-BMT**, нажав на иконку.
- ✓ В редакторе программ амплификации выберете шаблон и нажмите кнопку **Применить**.
- ✓ Используя инструкцию, введите программу амплификации:


№ стадии	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип стадии
1	52	20	0	1		Инкубация
2	95	10	00	1		Инкубация
3	95	0	05	4		Цикл
	60	0	25			
4	95	0	05	44		Цикл
	60	0	25		✓ Детекция	

Нажмите **OK** и сохраните программу под именем **Coronavir f/d-BMT**. 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 выберете **Работа с прибором** и **Добавить тест**. В окне добавления теста выберете **Coronavir f/d-VMT**.
- ✓ 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 **Сt(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** → **Coronavir f/d-VMT** → **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 РНК Коронавируса кошек и собак

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 «Сt» 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.
1. Отрицательный контроль – не определяется.
 2. Внешний Контрольный Образец детектируются по каналу **FAM**.
 3. Геном Коронавируса кошек и собак, а также Положительный Контрольный Образец **СТ**, 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
Coronavir f/d CT кДНК	Не определяется	20 — 30

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 по каналу FAM	Ct < 36	Ct > 36
	Результат Положительный	Результат Отрицательный
Ct < 34 Выделение образца прошло успешно	РНК вируса обнаружена. Проба считается положительной.	РНК вируса не обнаружена. Проба считается отрицательной.
Ct > 34	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: dvleman@gmail.com, а также по телефону: **+7 977 516 86 53**.

Дата выдачи: **20.04.2020**

М.П.

Подпись технолога: _____ /Леман Д.В.