



ОРГАНИК ТЕСТ

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор



ООО «ОрганикТест»

Рябов И. В.

ORG-233-50-mod

**Инструкция по применению набора реагентов для выявления вируса
АЧС методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в
режиме «реального времени»**

Ген директор  Рашкина И.И.



ORG-233-50-mod

Инструкция по применению набора реагентов для выявления вируса АЧС методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Назначение набора реагентов

Набор реагентов предназначен для определения генома вируса африканской чумы свиней (далее – АЧС) (ДНК или фрагментов генома) в клиническом и патологическом материале и в инфицированной культуре клеток (при выделении вируса в данной системе), в продуктах свиноводства и пищевых изделиях свиного происхождения (включая свиной шпик, фарш, колбасные изделия, студень и др.), а также в кормах, предназначенных для свиней в режиме «реального времени» методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Форма выпуска набора

Набор реагентов выпускается в форматах на 50 и 100 исследований, и состоит из набора для выделения нуклеиновых кислот (порядок работы указан в приложении 1) и набор для амплификации участка генома вируса АЧС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (порядок работы указан в приложении 2).

Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других м и к роорганизмов вируса классической чумы свиней, вируса болезни Ауески, парвовируса свиней, вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней, вируса эпидемической диареи свиней; ротавируса, вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней; *Bordetella bronchiseptica*; *Brucella suis*; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella Dublin*; *Yersinia enterocolitica*, *Chlamydia suis*; *Haemophilus parasuis*; *Klebsiella pneumoniae*; *Leptospira interrogans*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasterella multocida*; *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Предел детекции метода - не хуже 0,01% вируса АЧС в продукте.

Проведение исследования с использованием набора реагентов

При работе необходимо соблюдать общие требования к лабораториям, использующие методы амплификации ДНК

Отбор и подготовка проб

Для исследования используют следующие материалы:

- Цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

- Для получения сыворотки забирают кровь в пробирку без антикоагулянта

- Мазки со слизистой носоглотки и миндалин снимают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мкл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора

- Фрагменты органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.) отбирают в стерильные контейнеры.

- Лимфоузлы берут на исследование целиком.

- Продукты свиного происхождения и изделия (куски свинины, свиной шпик, фарш, колбасные изделия, студень, свиную кожу и др.) отбирают в стерильные контейнеры.

- Корма, предназначенные для свиней.

- Клеточные культуры.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8°C – в течение суток
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца
- при температуре не выше минус 68°C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, мазки со слизистой носоглотки и миндалин, культуры клеток используют для выделения ДНК без предварительной подготовки.

Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 °C до 8 °C более 1 ч после ее взятия, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Переносят плазму в количестве не менее 1 мл одноразовыми наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

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, используя центрифугу «MiniSpin», Eppendorf, Германия или аналог) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Исследуемые пробы тканей, органов и продуктов свиного происхождения (небольшие кусочки до 1 г весом) гомогенизируют с использованием стерильных ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов. Затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 600–1600 g (3000 об./мин, используя центрифугу «MiniSpin», Eppendorf, Германия или аналог) в течение 1 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (75 мкл) используют для экстракции ДНК.

Порядок работы с набором для выделения нуклеиновых кислот

Состав набора для выделения нуклеиновых кислот:

Реагент	Количество/объем, мл
Лизирующий буфер	1 флакон (20 мл)
Раствор для отмывки	1 флакон (по 50 мл)
Элюирующий буфер	1 флакон (15 мл)
Сорбент	1 пробирка (по 1,1 мл)
ОКО-В	1 пробирка (1 мл)

Экстракция ДНК из образцов

1. Прогрейте лизирующий буфер перед использованием до полного растворения осадка при температуре +65 °С

2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл клинического материала (кровь), используя для каждого образца отдельный наконечник с аэрозольным барьером, добавить 50 мкл ОКО-В (либо лизирующего буфера). Если производится экстракция ДНК из иного материала, необходимо вносить в пробирки по 75 мкл (для жидких образцов) без разбавления их, для твердых образцов - до нижней риски пробирки. В пробирку, маркированную «ОКО-В», внести 75 мкл ОКО-В. Пробирки плотно закрыть. Перемешать на вортексе 3-5 секунд.

3. Разморозить ВКО при комнатной температуре, тщательно перемешать, сбросить капли коротким центрифугированием при 1,5-2,4 тыс. об/мин; в каждую пробирку внести по 10 мкл раствора ВКО (при необходимости использования ВКО, если ВКО не используется, то данный пункт допускается пропустить).

4. Внести в пробирки по 300 мкл лизирующего буфера

5. Инкубировать при +65 °С в течение 5 минут в твердотельном термостате. В процессе инкубации необходимо тщательно перемешивать содержимое пробирок на вортексе каждые 2 минуты в течение 5-7 секунд. Если у термостата предусмотрена функция шейкирования, вортексирование каждые 2 минуты не требуется, достаточно выставить скорость вращения 1300 об/мин. По окончании инкубации достать пробирки из термостата и выдержать при комнатной температуре в течение 2 минут, после чего содержимое тщательно перемешать на вортексе.

Внимание! Пробирки должны быть плотно закрыты во избежание их открывания в процессе прогрева.

6. Осадить материал в пробирках центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30-60 секунд. Не захватывая образец, максимально отобрать супернатант в отдельную пробирку, используя одноразовые наконечники для пипеток без аэрозольного барьера. Использовать супернатант для дальнейшей экстракции (при работе с суспензиями данный пункт -исключить).

7. Ресуспензировать сорбент на вортексе до исчезновения видимого слоя осадка и внести в каждую пробирку по 20 мкл сорбента. Оставить пробирки в штативе на 5 минут, каждые 2 минуты перемешивая на вортексе.

8. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30-60 секунд. Не захватывая сорбент, максимально отобрать супернатант

медицинским отсасывателем, используя одноразовые наконечники для пипеток без аэрозольного барьера.

9. Добавить в пробирки по 900 мкл раствора для отмывки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать пробирки при 10000 об/мин в течение 30-60 секунд и не захватывая сорбент, максимально отобрать супернатант медицинским отсасывателем. На стенках пробирки не должно остаться никаких капель.

10. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре +65 °C на 5-10 минут для подсушивания сорбента.

Внимание! Раствор для отмывки содержит вещества, которые могут ингибировать ПЦР. Если после подсушивания сорбент влажный, поместите пробирки в термостат еще на 5-10 минут.

11. Добавить в пробирки по 100 мкл элюирующего буфера. Пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента и поместить в термостат с температурой +65 °C на 5 минут. В процессе инкубации необходимо тщательно перемешивать содержимое пробирок на вортексе каждые 2 минуты в течение 5-7 секунд. Если у термостата предусмотрена функция шейкирования, вортексирование каждые 2 минуты не требуется, достаточно выставить скорость вращения 1300 об/мин. Допускается увеличение объема элюции до 300 мкл.

Внимание! Пробирки должны быть плотно закрыты во избежание их открывания в процессе прогрева.

12. По окончании инкубации достать пробирки из термостата и выдержать при комнатной температуре в течение 2 минут, после чего содержимое тщательно перемешать на вортексе.

13. Пробирки центрифугировать при 12000 об/мин в течение 1-2 минут. Пробы готовы к использованию, надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Допускается хранение проб вместе с сорбентом. При отделении ДНК от сорбента пробы необходимо перемешать на вортексе, а затем центрифугировать в течение 1-2 минут при 12000 об/мин. Отбирать надосадочную жидкость необходимо так, чтобы не взбаламутить осадок и не захватить частицы сорбента.

Примечание: полученные пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре +2...+8 °C или в течение года при температуре -18...-22 °C. Перед повторным использованием пробы необходимо тщательно перемешать на вортексе и повторить центрифугирование в течение 1-2 минут при 12 тыс. об/мин, если пробы ДНК хранились вместе с сорбентом или при отделении ДНК от сорбента в пробы попали частицы сорбента.

Устранение проблем

В процессе пробоподготовки могут возникать проблемы, в той или иной степени влияющие на результат анализа.

1. Низкий выход ДНК

- Использован избыточный объем образца. Не используйте объемы больше указанных в протоколе. Сорбент имеет ограниченную емкость. В случае если полученное количество ДНК значительно меньше ожидаемого, разбавьте пробу в 2-10 раз для снижения расхода образца.

- Ненадлежащие условия хранения образца. Храните образцы в соответствии с инструкцией.

- Исходный материал не был полностью лизирован. Прогревайте лизирующий буфер перед использованием до полного растворения осадка.

2. ПЦР идет с низкой эффективностью

- Очищенная ДНК содержит остатки раствора для отмывки. Максимально удаляйте раствор для отмывки и проводите высушивание сорбента в соответствии с протоколом.

3. ДНК разрушена

- Ненадлежащие условия хранения ДНК. Храните образцы в соответствии с инструкцией.

Меры предосторожности

1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарноэпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

2. Обработку клинического материала и выделение ДНК необходимо проводить в зоне выделения нуклеиновых кислот согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

3. Персонал, проводящий исследования с использованием данного набора реагентов, должен владеть навыками выделения ДНК из клинического материала и работы на соответствующем оборудовании.

4. Перед началом работы ознакомьтесь с инструкциями на все используемое оборудование и комплекты реагентов. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

5. Для выделения ДНК следует иметь два набора пипеток полуавтоматических одноканальных со сменными наконечниками: для работы с клиническими образцами и ПКО; для внесения реагентов, в том числе ВКО.

6. Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников с аэрозольным барьером для полуавтоматических пипеток, если не указано иначе. Для каждого образца ДНК (в том числе контролей) использовать отдельный наконечник.

7. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.

8. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10. Наборы, в которых обнаружена контаминация реагентов, должны быть утилизированы как биологический материал.

Внимание! Лизирующий буфер содержит Казеинат натрия животного

происхождения и хаотропные агенты в высоких концентрациях. При работе с набором необходимо использовать одноразовые перчатки.

Внимание! При работе с легковоспламеняющимися жидкостями необходимо соблюдать правила пожарной безопасности.

Внимание! Не допускать контакта компонентов набора с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте обильно промыть участок контакта водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

Внимание! В состав ОКО-В входит азид натрия в концентрации 0,05 %. При попадании компонентов с ним на кожу: смыть большим количеством воды с мылом. При попадании в глаза: промыть глаза водой. При попадании в желудок: прополоскать рот водой. Получить консультацию у врача.

Условия транспортирования

Набор для амплификации участка генома вируса АЧС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» транспортировать при температуре от 2 до 8°C не более 7 суток в всеми видами крытых транспортных средств.

Набор для выделения нуклеиновых кислот транспортировать при температуре от 2 до 25°C не более 7 суток в всеми видами крытых транспортных средств.

Условия хранения

Хранить в течение срока годности.

При хранении набор необходимо разукomплектовать.

Реагенты для выделения ДНК хранить при температуре от 2 до 8°C в защищённом от солнечного света месте. Не допускается замораживание реагентов.

Набор для амплификации участка генома вируса АЧС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» хранить при температуре от -20 до -18°C в защищённом от солнечного света месте.

Порядок работы с набором для амплификации участка генома вируса АЧС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Проведение амплификации ДНК с детекцией в режиме «реального времени»

Состав набора для амплификации участка генома вируса АЧС с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:

Реагенты для ПЦР				
№	Реагент	Внешний вид Объем, мкл 50 / 100 исследований	Объем, мкл 50 / 100 исследований	
1	«ПЦР смесь АЧС»	Прозрачная бесцветная жидкость	550	1100
2	«ПЦР буфер»	Прозрачная бесцветная жидкость	300	550
3	«Taq полимераза»	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	30	55
Комплект контрольных образцов				
4	Внутренний контрольный образец выделения ДНК, «ВКО»	Прозрачная бесцветная жидкость	550	1100
5	Отрицательный контрольный образец ПЦР, «К-»	Прозрачная бесцветная жидкость	110	220
6	Положительный контрольный образец ПЦР (ПКО), «К+»	Прозрачная бесцветная жидкость	110	220

В отдельной пробирке смешивают компоненты набора из расчета на одну реакцию ПЦР

10 мкл «ПЦР смеси АЧС»;

5 мкл «ПЦР буфера»;

0,5 мкл «Taq полимеразы».

При приготовлении смеси для амплификации пробирки с наименованиями «ПЦР смесь АЧС», «ПЦР буфер», Положительный контрольный образец ПЦР (ПКО), «К+» разморозить и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования, – для пробирок: Отрицательный контрольный образец ПЦР, «К-» и «Taq полимераза» необходимо только сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования. Расчет компонентов проводят по формуле: $N+1$, где N сумма образцов: (положительного контрольного образца ПЦР, «ПКО»(К+), количество исследуемых образцов, отрицательного контрольного образца выделения ДНК («ОКО-В»), отрицательного контрольного образца ПЦР («К-»)) ($N = N_{\text{«К+»}} + N_{\text{образцов}} + N_{\text{«ОКО-В»}} + N_{\text{«К-»}}$)

Для удобства расчета количества ПЦР-смеси приведена таблица ниже:

Приготовление реакционной смеси:			
Кол-во реакций	ПЦР смесь, мкл	«ПЦР буфер, мкл	«Taq Полимераза», мкл
1	10	5	0,5
5	50	25	2,5
8	80	40	4
12	120	60	6
16	160	80	8
19	190	95	9,5
24	240	120	12
27	270	135	13,5
36	360	180	18
Общий объем реакции - 25 мкл. Объем ДНК-пробы 10 мкл.			

Смесь кратковременно перемешивают на вортексе или встряхивают в руках, осаждают капли центрифугированием, затем вносят по 15 мкл смеси в пробирки для ПЦР.

Используя наконечники с аэрозольным барьером, в подготовленные пробирки добавляют по 10 мкл ДНК испытуемых образцов, включая образцы «ОКО-В» и «К-».

! Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

Ставят контрольные реакции амплификации

- Отрицательный контрольный образец (**К-**) – вместо ДНК-пробы вносят в пробирку 10 мкл «К-»;
- отрицательный контрольный образец выделения («**ОКО-В**») - вместо ДНК-пробы вносят в пробирку 10 мкл «ОКО-В»
- положительный контрольный образец (**К+**) – вносят в пробирку 10 мкл «К+».

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Программирование и запуск приборов Rotor-Gene Q QIAGEN, Германия, Rotor-Gene 6000 Corbett Research Pty Ltd., Австралия

Программирование амплификаторов проводят в соответствии с указаниями Инструкции по эксплуатации.

1. Включить тумблер прибора, запустить программу для амплификации «Rotor-Gene»
2. В окне «New Run/Новый тест» выбрать вкладку «Advanced/Детальный мастер». Во вкладке «Advanced/Детальный мастер» в правом углу нажать кнопку «New/Новый».
3. В открывшемся окне выбрать тип ротора, поставив галочку напротив «36-well Rotor/36-луночный ротор», поставить галочку напротив «Locking Ring Attached/Кольцо закреплено» (**Вставить образцы!**), нажать на кнопку «Next/Далее».
4. В открывшемся окне «Master of new test/Мастер нового окна» вписать оператора, объем реакции 25 μ L, убрать галочку «15 μ L oil layer volume / Объем масла/воска» и нажать кнопку «Next/Далее»
5. В открывшемся окне нажать кнопку «Edit Profile/Редактор профиля», затем выбрать вкладку «New/Новый» и выбрать «Cycling (default)/Циклирование (по умолч.)».

Создать программу амплификации, установить следующие условия:

Температура	Время	Детекция флуоресценции	Число циклов
95 °C	5 мин	—	1
95 °C	10 с	—	40
55 °C	20 с	Green Yellow	
72°C	20 с	—	

Обратите внимание, что детекция должна быть при температуре 55 °C. Детектирование можно выбрать нажав кнопку «Detect Cycling A/Детект Cycling A». Откроется окно «Acquisition/Детекция сигнала». Чтобы выбрать детектирование данных на канале выберите необходимые каналы (указанные выше в таблице) из списка слева и нажмите «>» в столбец «Acquiring Channels/Детектировать каналы», чтобы удалить каналы из этого списка воспользуйтесь клавишей «<». Нажмите клавишу «ОК»

Чтобы амплификатор сохранил все настройки, нажмите в окне «Edit Profile/Редактор профиля» кнопку «ОК»

Для оптимизации уровня сигнала нажать клавишу «Gain optimization /Опт.уровня сигнала» функцию: поставить галочку напротив «Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Выбрать каналы: Green, Yellow. Установить параметры для каналов Green, Yellow, нажав кнопку «Edit/Правка», при этом откроется окно «Auto-Gain Optimization Channel Setting/Установки Авто-оптимизации уровня сигнала»: позиция пробирки 1, нужный диапазон стартового сигнала от 5 до 10 Fl. Диапазон уровней сигнала от - 10 до 10, нажать клавишу «ОК». При этом останется открытым окно «Auto-Gain Optimization Setup /Авто-оптимизация канала» его нужно закрыть клавишей «Close/Заккрыть»

После настроек редакции профиля и оптимизации уровней сигналов нажмите клавишу «Next/Далее». Откроется окно «Master of new test/Мастер нового окна» с выставленными параметрами, если все параметры соответствуют указанным в программе амплификации данным, то запускаем работу прибора кнопкой «Start run/Старт»

Для анализа результатов открыть нужный файл и в меню программы выбрать «Analysis/Анализ», в открывшемся окне выбрать вкладку «Quantitation/Количественный». Выбрать вкладку Yellow и нажать клавишу «Show/Показать». В открывшемся окне появятся кинетические кривые в логарифмическом виде. Для анализа выбрать «Linear Scale/Линейный вид» шкалы в нижней части графика, также должны быть активированы кнопки «Dinamic Tube/Динамич. фон и «Slope correct/Коррек. уклона». Необходимо активировать вкладку «Outlier Removal/Устранение выбросов», где в открывшемся окне указать 10%. Выставить *Threshold/Порог* = 0.01. Для вкладки Green провести аналогичные настройки. В таблице результатов появятся значения пороговых циклов, Ct, для исследуемых образцов.

Программирование и запуск прибора CFX96 Touch ,Bio-Rad США, CFX96 Bio-Rad,США.

Программирование амплификаторов проводят в соответствии с указаниями Инструкции по эксплуатации.

1. Включить тумблер прибора, запустить программу для амплификации «Bio-Rad CFX Manager»

2. В меню File выбрать «New» затем «Protocol»

3. Создать программу амплификации, установить следующие условия:

1	95 °C	5 мин
2	95 °C	10 с
3	55 °C	20 с
	+Plate Read	
	72°C	20 с
4	GOTO 2 . 40 more times	
END		

Нажать «ОК» и сохранить в удобной рабочей папке.

4. Для выбора красителей в окне Plate Editor выбираем Select Fluorophores, ставим галочки рядом с красителям для системы «АЧС» - FAM, HEX. Нажать кнопку «ОК»

5. Обозначить на плашке месторасположение образцов. Для этого выделить лунку, в которой находится образец и в графе Sample Type выбрать строчку «Unknown». Задать измерения сигнала во всех пробирках по выбранным красителям. Для этого выделить на плашке все лунки и поставить галочки в колонке Load напротив названий необходимых в данной постановке красителей.

6. Задать названия для всех образцов, выделяя необходимую лунку и в графе Simple Name имя соответствующего образца, затем - галочку в графе Load. Повторить то же самое для оставшихся образцов, включая, «ОКО-В», «К-» и «К+». Нажать «ОК» и дать имя плашке и сохранить полученный файл на компьютере в удобной рабочей папке.

7. Запустите прибор, выбрав вкладку «Start Run», в которой нажать клавишу «Start Run». Задать имя файла и сохранить.

При анализе результатов пороговая линия устанавливается прибором автоматически.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала на всех каналах.

В таблице результатов появятся значения пороговых циклов, Ct, для исследуемых образцов.

Программирование и запуск приборов ДТ-322 ООО «Днк-Технология» Россия, ДЛ лайт ООО «Днк-Технология» Россия, ДТ прайм ООО «Днк-Технология» Россия, ДТ-96 ООО «Днк-Технология» Россия

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме: «Работа с прибором».

При первом проведении ПЦР создайте и сохраните новый тест:

1. В выпадающем меню «Тест» выберите строку «Создать/Редактировать тест».
2. В новом окне выберите кнопку «Создать новый тест».

3. Введите имя для нового теста и нажмите «Ок».

4. В новом окне «Тест» заполните следующие параметры: тип проводимого анализа «Качественный», метод - относительный (Ct), типы пробирок, объем рабочей смеси в пробирке - 25 мкл, флуорофоры - Fam, Hex.

- типы пробирок: образец, контроль+, контроль-.

Программа амплификации для данных приборов:

№ блока	Температура, °C	мин	сек	Число циклов	Детекция
1	95	5	0	1	
2	95	0	10	40	
	55	0	20		☒
	72	0	20		

5. Нажмите кнопку «Ок», тест будет сохранен.

При повторном проведение амплификации на главной странице меню «Протокол» во вкладке «Добавить тест» выберите из списка сохраненный Вами ранее тест.

1. Укажите количество исследуемых образцов, нажмите кнопку «Ок» и название проб в строке «Идентификаторы»

2. Отметьте расположение пробирок в матрице термоблока в соответствии с их установкой (если термоблок заполнен не полностью, рекомендуется устанавливать пробирке по центру термоблока)

3. Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол»

4. В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации

5. Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

6. В новом окне укажите имя файла и папку для сохранения .

7. Нажмите кнопку «Ок», тест будет сохранен

Для анализа результатов выбрать метод «пороговый Ct». Далее выбрать значок «Выбрать инструментальную панель» (выглядит как шестеренка), выбрать «тип анализа» - «мультиплекс».

Программирование и запуск приборов Quant Studio 3 Applied Biosystems, CIIA и Quant Studio 5 Applied Biosystems, CIIA

Запустите программное обеспечение Quant Studio Design and Analysis Software, откроется окно с выбором параметра «New experiment/Новый эксперимент» либо «Open existing experiment/Открыть эксперимент» (Выбор окна «Open existing experiment/Открыть эксперимент» происходит, если необходимо открыть сохраненный шаблон либо для анализа прошедшей амплификации. Для постановки нового эксперимента/создания нового шаблона необходимо выбрать «New experiment/Новый эксперимент»).

Пот выборе окна «New experiment/Новый эксперимент» открывается окно «Experiment Properties/Свойства эксперимента». В этом окне присваиваем «Name/Название» эксперимента, при необходимости «Barcode/Штрих код», «User name/Имя пользователя», оставить комментарий к эксперименту. Выбрать тип прибора Quant Studio 3 или Quant Studio 5, блока (это зависит от типа прибора) , тип эксперимента - Standard Curve/стандартная кривая, TaqMan Reagents/реагенты TaqMan,

режим запуска - «Стандартный», после выбора свойств нажмите клавишу «Next/Далее». Откроется вкладка «Protocol/Протокол», в окне «Experiment Method/Протокол эксперимента» указывается объем реакции 25 μL , скорость реакции стандартная 1,6 $^{\circ}\text{C/s}$, далее «Hold Stage/Стадия удержания» - 95 $^{\circ}\text{C}$ и 15 мин «Step1/шаг 1», «PCR Stage/Стадия ПЦР» 95 $^{\circ}\text{C}$ и 10 с «Step1/шаг 1», детектирование происходит в стадии ПЦР «Step2/шаг 2» 56 $^{\circ}\text{C}$ и 20 с (при этом должен быть активным значок фотоаппарата). Под температурным графиком реакции амплификации выберите количество циклов 40. Нажмите клавишу «Next/Далее».

температура	время	детекция флуоресценции	число циклов
95 $^{\circ}\text{C}$	5 мин	—	1
95 $^{\circ}\text{C}$	10 с	—	40
55 $^{\circ}\text{C}$	20 с	Fam VIC	
72 $^{\circ}\text{C}$	20 с		

Откроется вкладка «Plate/Планшет» окно «Assign Targets and Setup/Назначить мишени и образцы», войти во вкладку «Quick Setup/Быстрые настройки» и в самом нижнем окне «Plate attributes/Атрибуты планшета», в выпадающем меню «Passive reference/Пассивный рефер.» выбрать «None/Нет» далее зайти во вкладку «Advanced Setup/Расширенные настройки», выбрать «Targets/Мишени», кнопкой «+» добавить необходимое количество каналов, в нашем случае: во вкладке «репортер» Fam, VIC, во вкладке «Name/Название» каналы должны быть идентичны репортерам. В окне «Samples/Образцы» в меню «Sample Name/наименование образцов» вписать наименование проб. Для ввода на планшете образца и типа канала детекции, мы кнопкой мыши выделяем область и ставим галочки напротив названия в окне «Samples/Образцы», и галочки в окне «Targets/Мишени» напротив необходимых каналов - так делаем на все необходимые пробы. После заполнения плашки, нажимаем клавишу «Next/Далее».

Открывается вкладка «Run control/Запуск». Для сохранения шаблона в правой верхней части нужно нажать клавишу «Save as/сохранить как» и сохранить шаблон в удобной папке на компьютере. При открытии этой вкладки необходимо чтобы пробы находились в амплификаторе. При нажатии кнопки «Start run/Начать прогон» появится кнопка с серийным номером прибора, при нажатии которой появится окно сохранения и прибор начнет амплификацию.

Для анализа результатов открыть вкладку «Results/Результаты» в открывшемся окне выбрать кнопку «Show plot settings/Показать настройки графика», (в форме глаза на верхней панели), где тип графика « ΔRn vs Cycle зависимость ΔRn от цикла», «Linear/линейный», цвет «Target/мишень» либо «Sample/образец», заблокировано «All/Все». Пороговое значение ставится галочка напротив «Auto/Авто» и выставляется галочка напротив «Auto Baseline/Автоматическая базовая линия». Для того чтобы скрыть меню «Show plot settings/Показать настройки графика» необходимо нажать на любое место на экране клавишей мышки.

В окне появятся график амплификации кинетические кривые в линейном виде. (Анализ результатов провидится только при окончании амплификации, так как после амплификации, автоматически вычитается фон из базовой линии, происходит коррекция уклона и устранение выбросов).

Анализ и интерпретация результатов амплификации.

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).

Контроли	Контролируемый этап	Значение порогового цикла Ct по каналу Green/FAM	Значение порогового цикла Ct по каналу Yellow/R6G/HEX/VIC
ОКО-В	Экстракция ДНК	≤ 37	Нет значений
К-	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	≤ 32	≤ 32

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и для контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций, представленной в инструкции по применению производителя диагностической системы.

Образец считается отрицательным (ДНК вируса АЧС не обнаружена) если не наблюдается рост специфического сигнала на канале Yellow/R6G/HEX/VIC, при этом значение Ct по каналу FAM/Green определяется не позднее 37 цикла.

Образец считается положительным (ДНК вируса АЧС обнаружена) если наблюдается рост сигнала на канале Yellow/R6G/HEX/VIC, при этом значения Ct менее 37.

Образец считается положительным (ДНК вируса АЧС обнаружена) если наблюдается рост сигнала на канале Yellow/R6G/HEX/VIC на одном из повтора образца, при этом значения Ct менее 37.

Образец считается спорным если значение Ct на канале Yellow/R6G/HEX/VIC определяется с 37 цикла или позднее.

Отсутствие положительного сигнала или превышение пограничного значения Ct (>32) в пробе «К+» может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе ПЦР. В таком случае необходимо провести этап ПЦР повторно.

Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции («ОКО-В») на канале Yellow/R6G/HEX/VIC или для отрицательного контроля ПЦР («К-») на обоих каналах свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. Требуется повторить исследование, начиная с этапа экстракции ДНК.

Образцы, для которых по каналу FAM/Green значение Ct отсутствует (и при этом по каналу Yellow/R6G/HEX/VIC отсутствует значение Ct) требуют повторного проведения исследования с этапа экстракции ДНК. Отсутствие в значениях пороговых циклов для образцов на канале FAM/Green указывает на присутствие ингибиторов в пробе(ах) или на ошибки при экстракции ДНК или постановке реакции. *! Требуется провести исследование, начиная с этапа экстракции ДНК.*

Образец считается отрицательным (ДНК вируса АЧС не обнаружена) если не наблюдается рост специфического сигнала на канале Yellow/R6G/HEX/VIC, при этом значения Ct по каналу FAM/Green и Ct контрольных образцов находятся в пределах нормы.

Образец считается положительным (ДНК вируса АЧС обнаружена) если наблюдается рост сигнала на канале Yellow/R6G/HEX/VIC, при этом значения C_t контрольных образцов находятся в пределах нормы. Если при этом значение C_t определяется позднее 37 цикла при корректном прохождении положительных и отрицательных контроле – он считается спорным и исследуется повторно с этапа выделения ДНК. Если при повторно постановке наблюдается схожий результат (C_t на канале Yellow/R6G/HEX/VIC X/Yellow более 37), требуется повторное взятие материала для проведения исследования. В случае получения положительного результата ($C_t \leq 37$) при исследовании повторно взятого от животного материала - образец считать положительным (ДНК вируса АЧС присутствует).

При исследовании образцов продукции свиного происхождения (сосиски, колбасы, фарш и т.п.) допустимо считать образец содержащий ДНК вируса АЧС при значении $C_t > 37$ (Yellow/R6G/HEX/VIC) при повторении результата в повторном исследовании с этапа экстракции ДНК. Требуется параллельно провести исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения внутрилабораторной контаминации. В случае получения при повторном исследовании образца значения C_t по каналу Yellow/R6G/HEX/VIC больше 37 и отрицательного результата исследования смывов, образец считать положительным.

При определении C_t (Yellow/R6G/HEX/VIC) не позднее 37 цикла при прохождении положительных и отрицательных контролей, при этом C_t внутреннего контрольного образца «ВКО» на канале FAM/Green не определяется рекомендуется повторить исследование образца на этапе ПЦР и если при повторном исследовании значения C_t по каналу Yellow/R6G/HEX/VIC определяется не позднее 37 цикла, то образец считать положительным (ДНК вируса АЧС присутствует).

При определении C_t (Yellow/R6G/HEX/VIC) позднее 37 цикла при корректном прохождении положительных и отрицательных контролей и определяя C_t (Yellow/R6G/HEX/VIC) как спорный допускается повторить этап выделения ДНК без использования внутреннего контрольного образца выделения ДНК «ВКО». В случае получения положительного результата ($C_t \geq 37$) при выделении ДНК животного материала без ВКО - образец считать положительным (ДНК вируса АЧС присутствует) при отрицательном результате исследования смывов.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации.

Условия хранения и транспортировки:

ORG-233-50-mod Диагностическая система: набор реагентов для выявления вируса АЧС методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Набор для выделения нуклеиновых кислот

Условия транспортирования

Набор транспортировать при температуре окружающей среды в контейнерах всеми видами крытого транспорта не более 7 суток.

Условия хранения

Хранить 12 мес. от +2 до +8°C

Набор для амплификации участка генома вируса АЧС с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Условия транспортирования

Набор транспортировать при температуре от +2 до +8°C в контейнерах с холодоэлементами всеми видами крытого транспорта не более 7 суток.

Условия хранения

Хранить 12 мес. при от -18°C до -20°C. Не разрешается проводить более 10 размораживаний, при необходимости большего числа размораживаний следует провести аликвотирование реагентов.



ОРГАНИК ТЕСТ

По вопросам качества диагностической системы набора реагентов для выявления вируса АЧС методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» или по вопросам приобретения других наборов нашего производства просьба направлять обращения на адрес orgtest@yandex.ru



Памятка: «АЧС»

Условия ПЦР			
Температура	Время	Детекция	Число циклов
95 °C	5 мин	—	1
95 °C	10 с	—	40
55 °C	20 с	Green (FAM) Yellow (VIC, HEX)	
72°C	20 с	—	

Интерпретация результатов - для контрольных образцов

Контроли	Этап	Ct, Green/FAM	Ct, Yellow / R 6 G / HEX/VIC
ОКО-В	Экстракция ДНК	≤ 37	Нет значений
К-	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	≤ 32	≤ 32

Интерпретация результатов - для исследуемых образцов

№	Green/FAM	Yellow / R 6 G / HEX/VIC	Результат
1	$Ct \leq 37$	$Ct < 37$	ДНК вируса АЧС обнаружена
2	$Ct \leq 37$	Нет значений	ДНК вируса АЧС не обнаружена
3	Нет значений	Нет значений	Повторное проведение исследования с этапа экстракции ДНК
4	Нет значений	$Ct \leq 37$	ДНК вируса АЧС обнаружена
5	$Ct \leq 37$	$Ct > 37$	ДНК вируса АЧС обнаружена

* При повторении результата («Ct>37») для клинического и паталогического материала результат трактуется как «сомнительный», необходим перебор материала от животного. При повторении результата («Ct >37») для образцов продукции свиного происхождения допустимо считать образец **содержащим ДНК вируса АЧС (низкое содержание)**.

Лист регистрации изменений

[illegible]