

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.В. Малеев

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «БРУ-КОМ» для выявления возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «БРУ-КОМ» предназначена для выявления ДНК микроорганизмов рода *Brucella* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления ДНК микроорганизмов рода *Brucella* основан на экстракции ДНК из исследуемого материала, совместно с ДНК неконкурентного **экзогенного внутреннего контрольного образца**, проведении амплификации специфических участков ДНК микроорганизмов рода *Brucella* за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Таq-полимеразы.

Для форм комплектации с электрофоретической детекцией, применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Таq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95 °С, что значительно

снижает количество неспецифически затравленных реакций, специфический продукт амплификации имеет определенный размер и детектируется методом электрофореза в агарозном геле.

Для форм комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», в составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Неконкурентный экзогенный внутренний контрольный образец, позволяет контролировать основные этапы ПЦР-анализа (экстракцию ДНК и амплификацию ДНК).

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,2

Форма 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Формы 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, электрофоретической детекции, рекомендованные Изготовителем.

Форма 3 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Формы 1, 2, 3 рассчитаны на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 – комплект реагентов для амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella* – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-R <i>Brucella</i> spp., раскапана под воск	0,005	55 пробирок объемом 0,5 мл
ПЦР-смесь-2 blue	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО <i>Brucella</i> spp.	0,5	1 пробирка

«ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,2 – комплект реагентов для амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella* – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-R <i>Brucella</i> spp., раскапана под воск	0,005	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2 blue	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО <i>Brucella</i> spp.	0,5	1 пробирка

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella* с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Brucella</i> spp., раскапана под воск	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа в экстракции:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОКО	1,2	1 пробирка
ВКО STI-704	0,5	1 пробирка

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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.

ВНИМАНИЕ! Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных

уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмыwania в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «ДНК-сорб-В».
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация

3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемым комплектом реагентов) (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
6. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

7. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
8. Программируемый амплификатор для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или другие, рекомендованные Изготовителем - при работе с формой комплектации с электрофоретической детекцией).
9. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия) или iCycler iQ/iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, или другие, рекомендованные Изготовителем) - при работе с формой комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

13. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» – при работе с формой комплектации с электрофоретической детекцией.
14. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции продуктов амплификации – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

Материал от каждого животного отбирают отдельным инструментом.

Для исследования используют следующий клинический материал: содержимое брюшной полости и желудка, селезенка,

Форма 1: **REF** VET-9-R0,5-K; **REF** V-3041-4-5; Форма 2: **REF** VET-9-R0,2-K; **REF** V-3042-4-2

Форма 3: **REF** VET-9-FRT-K; **REF** V-3043-1-2 / **VER** 24.07.17 / стр. 7 из 31

печень абортрованного плода; плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных; содержимое бурс, гигром; кровь и молоко от абортировавших животных и (или) от животных, в сыворотке которых обнаружены агглютинины и (или) комплементсвязывающие антитела, синовиальная жидкость, пунктаты из лимфоузлов, культуры микроорганизмов.

Жидкости (кроме крови) для исследования отбирают в объеме 10-20 мл, из тканей и органов вырезают кусочки размером 1×1×1 см (при невозможности толщина кусочков может быть меньше). **Лимфоузлы берут целиком.**

Цельную кровь в объеме 5-10 мл берут в пробирки с предварительно добавленным антикоагулянтом (3 % раствор ЭДТА из расчета 10:1).

В случае убоя животных для исследования отбирают парные лимфатические узлы с обеих сторон туши целиком (парааортальные, надвыменные, паховые, тазовые) и кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка), от самцов с признаками орхита или эпидидимита отбирают семенники с придатками.

Материалы доставляют в лабораторию в день взятия или на следующий день, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала при температуре не выше минус 16 °С в течение 30 дней (кроме крови).

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

Пробы исследуемых жидкостей, кроме крови, в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора), центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл суспензии используют для экстракции ДНК.

Пробы цельной крови (консервированной ЭДТА), синовиальной жидкости, пунктаты из лимфоузлов, содержимое бурс и гигром, культуры микроорганизмов используют для экстракции ДНК без предварительной подготовки.

Пробы **паренхиматозных органов, семенников, плодовых оболочек, плаценты** (каждую отдельно) размером 1x1x1см, а

лимфатические узлы целиком, тщательно растирают в отдельных фарфоровых ступках с пестиками или в стеклянных гомогенизаторах, добавляют 1 мл стерильного физиологического раствора (т.е. примерно равный объем) и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем верхнюю фазу переносят в пробирки вместимостью 1,5 мл и 100 мкл ее используют для экстракции ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов - при использовании форм комплектации с электрофоретической детекцией

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК,
- электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле,
- анализ и интерпретация результатов.

при использовании формы комплектации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемого материала при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Лизирующий раствор и **раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли экстракции).

Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО (ВКО *Brucella spp.* или ВКО STI-704**, в соответствии с используемой формой) и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **лизирующим раствором** и ВКО внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Центрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на центрифуге. Если проба растворилась не полностью, центрифугировать пробирку на центрифуге 5 мин при максимальных оборотах и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.

Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на центрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить процедуру отмывки **раствором для отмывки 2**, удалить надосадочную жидкость полностью.

Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

Центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 мин. Надосадочная жидкость

содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

Амплификация и детекция продуктов амплификации

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплектов» вариант 50 R-0,5 или 50 R-0,2 и электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200 смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT и приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 2.

Порядок работы с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT и приборов iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 3.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,5 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант 50 R-0,2 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

Форма 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Brucella spp.* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «БРУ-КОМ» направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Форма 1: **REF** VET-9-R0,5-K; **REF** V-3041-4-5; Форма 2: **REF** VET-9-R0,2-K; **REF** V-3042-4-2

Форма 3: **REF** VET-9-FRT-K; **REF** V-3043-1-2 / **VER** 24.07.17 / стр. 12 из 31

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Амплификация

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

В «ПЦР-комплекте» вариант 50 R-0,5 и «ПЦР-комплекте» вариант 50 R-0,2 применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температуре 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R *Brucella* spp. для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2 blue, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-R *Brucella* spp.

Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

В подготовленные для ПЦР пробирки под масло, или непосредственно на масло, используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.
- в) внутренний контроль ПЦР (ВК+) – внести в пробирку 10 мкл ВКО *Brucella* spp. разведенного в 10 раз ДНК-буфером.

Б. Проведение амплификации

Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1

Программа для амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella*

	«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research)			Махугене (Ахуген)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	30 с	42
	65 °С	10 с		63 °С	25 с		63 °С	45 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	45 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		4 °С	хранение		4 °С	хранение	

Для прочих амплификаторов			
цикл	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	1 мин	42
	65 °С	1 мин	
	72 °С	1 мин	
3	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение	

После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3).

Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле (проводится в зоне 3 при помощи комплекта «ЭФ»)

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

А. Приготовление рабочих растворов и агарозного геля

Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – соединение, обладающее репродуктивной и острой токсичностью, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Агарозу для электрофореза ДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 65-70 °С.

Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **3 см** друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Б. Порядок работы

Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10-15 мкл проб** и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В **каждом** ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен **K+** и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры SE-2 («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

По завершении времени электрофореза (краситель при этом пройдет примерно половину длины геля (не менее 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

Анализ и интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

Микроорганизмов рода *Brucella* – 460 п.н.

Форма 1: **REF** VET-9-R0,5-K; **REF** V-3041-4-5; Форма 2: **REF** VET-9-R0,2-K; **REF** V-3042-4-2

Форма 3: **REF** VET-9-FRT-K; **REF** V-3043-1-2 / **VER** 24.07.17 / стр. 16 из 31

Внутреннего контрольного образца – 770 п.н.

В образце обнаружена ДНК микроорганизмов рода *Brucella*, если в дорожке, соответствующей этой пробе, присутствует специфическая светящаяся полоса на уровне 460 п.н. большей или меньшей интенсивности.

В образце не обнаружена ДНК микроорганизмов рода *Brucella*, если в дорожке, соответствующей этой пробе, отсутствует специфическая светящаяся полоса на уровне 460 п.н. и присутствует полоса ВКО на уровне 770 п.н.

Результат анализа невалидный, если для данной пробы отсутствуют обе полосы, и 460 и 770 п.н. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Кроме полос на уровнях 460 и 770 п.н., в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		460 п.н.	770 п.н.
OK	Экстракция ДНК	Нет	Есть
К-	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Нет
ВК+	ПЦР	Нет	Есть

Возможные ошибки:

1. В дорожке положительного контроля (К+) отсутствует специфическая полоса на уровне 460 п.н. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. В дорожках отрицательных контролей (OK, К-) присутствует специфическая полоса на уровне 460 п.н. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на

каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q - программу 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.

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

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

Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

На поверхность воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.*

В подготовленные для ПЦР пробирки используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.
- в) внутренний контроль ПЦР (ВК+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО STI-88.

Б. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы.
- В открывшемся окне выбрать меню **Advanced/Детальный мастер** и шаблон запуска эксперимента **Dual Labeled Probe/Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора **36-Well Rotor/36-луночный ротор**. 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 Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 µl oil layer volume/15 µL объем масла/воска**. (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 3

Программа амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella*

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	95	5 мин	-	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	10 с	-	10
	65	25 с		
	72	10 с		
Cycling 2/ Циклирование 2	95	10	-	35
	56	25	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10	-	

Форма 1: **REF** VET-9-R0,5-K; **REF** V-3041-4-5; Форма 2: **REF** VET-9-R0,2-K; **REF** V-3042-4-2

Форма 3: **REF** VET-9-FRT-K; **REF** V-3043-1-2 / **VER** 24.07.17 / стр. 20 из 31

- Нажать кнопку **ОК/Да**.
- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт.детек-мых**. Для обоих красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. сигнал** значение 5FI, а в графе **Max Reading/Максим. сигнал** значение 10FI. В графе **Tube position/Позиция Пробирки** указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр **gain/усиление сигнала**, по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Закрыть окно **Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала**, нажав кнопку **Close/Заккрыть**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
- Запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов**. Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

В. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ДНК *Brucella* (канал JOE/Yellow):

- Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale** видна кнопка **Log scale**).

- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть нажата кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** выставить **Threshold/Порог = 0.1**.

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

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**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale** видна кнопка **Log scale**).
- В меню основного окна **Quantitation analysis/Количественный анализ** должна быть нажата кнопка **Dynamic tube/Динамич.фон**.
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 0 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.1**.

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

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируют на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (**Ct**) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации

результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК микроорганизмов рода *Brucella*, если для данной пробы в таблице результатов значение *Ct* по каналу JOE/Yellow менее 33.

В образце **не обнаружена** ДНК микроорганизмов рода *Brucella*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow значения *Ct* отсутствуют (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу FAM/Green определено значение *Ct*, не превышающее 31.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow получено значение *Ct* больше 33, а значение *Ct* по каналу FAM/Green не превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена ДНК микроорганизмов рода *Brucella*.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow значение *Ct* не определено (отсутствует) или превышает 33, и по каналу FAM/Green значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК (см. табл. 4).

Таблица 4

Оценка результатов анализа контрольных образцов

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Экстракция ДНК	≤ 31	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	отсутствует	≤ 25
ВК+	ПЦР	≤ 25	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 4. Необходимо

повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.

2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу JOE/Yellow и/или для отрицательного контроля ПЦР (К-) на любом из каналов определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ», АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Подготовка проб для проведения ПЦР

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

Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

На поверхность воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.*

В подготовленные для ПЦР пробирки используя наконечники с фильтром, внести по 10 мкл проб ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.
- в) внутренний контроль ПЦР (ВК+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО STI-88.

Б. Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала.

– Для прибора iCycler iQ5 для создания схемы планшета в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать

измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Задать объем реакции (**Sample Volume**) 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.

- Для прибора **iCycler iQ** отредактировать схему планшета в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**. Для этого в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM** и **JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета, для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** справа. Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку **Run with selected protocol**. Задать программу амплификации.

Таблица 5

Программа амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	5 мин	-	1
2	95	10	-	10
	65	25		
	72	25		
3	95	10 с	-	35
	56	25 с	FAM, JOE	
	72	25 с	-	

- Для прибора **iCycler iQ5** для создания протокола 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**).

Форма 1: **REF** VET-9-R0,5-K; **REF** V-3041-4-5; Форма 2: **REF** VET-9-R0,2-K; **REF** V-3042-4-2

Форма 3: **REF** VET-9-FRT-K; **REF** V-3043-1-2 / **VER** 24.07.17 / стр. 26 из 31

– Для прибора **iCycler iQ** создать программу амплификации, выбрав опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Для этого в нижнем окне задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (BRUCOM.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**. Запустить выполнение выбранной программы **Brucella** с заданной схемой планшета.

– Для прибора **iCycler iQ5** 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** 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**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

В. Анализ результатов

Анализ результатов амплификации ВКО (канал FAM):

– Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа (в окне **Data File** модуля **Workshop**) и нажать кнопку **Analyze**. Выбрать в окне модуля данные по каналу **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base**

Line Subtracted Curve Fit (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.

- Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**. В опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **FAM-490**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице результатов появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК *Brucella* (канал JOE):

- Для прибора **iCycler iQ5** выбрать в окне модуля данные по каналу **JOE**, отключив кнопку **FAM**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для прибора **iCycler iQ** в опции **PCR Quantification** в меню **Select a Reporter** выбрать значок канала **JOE-530**. При этом должен быть выбран режим анализа данных **PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (выбирается по умолчанию). В меню **Threshold Cycle Calculation** выбрать режим ручной установки пороговой линии и автоматический расчет базовой линии. Для этого в подменю **Baseline Cycles** выбрать **Auto Calculated**, а в подменю **Threshold Position** выбрать **User Defined**. Чтобы установить уровень пороговой линии, нужно перетащить ее курсором при нажатой левой кнопке мыши. Нажать на клавишу **Recalculate Threshold Cycles**. В таблице

Форма 1: **REF** VET-9-R0,5-K; **REF** V-3041-4-5; Форма 2: **REF** VET-9-R0,2-K; **REF** V-3042-4-2

Форма 3: **REF** VET-9-FRT-K; **REF** V-3043-1-2 / **VER** 24.07.17 / стр. 28 из 31

результатов появятся значения *Ct*.

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируют на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

В образце **обнаружена** ДНК микроорганизмов рода *Brucella*, если для данной пробы в таблице результатов значение *Ct* по каналу JOE/Yellow менее 33.

В образце **не обнаружена** ДНК микроорганизмов рода *Brucella*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow значения *Ct* отсутствуют (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а по каналу FAM/Green определено значение *Ct*, не превышающее 31.

Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow получено значение *Ct* больше 33, а значение *Ct* по каналу FAM/Green не превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена ДНК микроорганизмов рода *Brucella*.

Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы по каналу JOE/Yellow значение *Ct* не определено (отсутствует) или превышает 33, и по каналу FAM/Green значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает 31. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции ДНК (см. табл. 6).

Таблица 6




Оценка результатов анализа контрольных образцов

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (C_t) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	≤ 31	отсутствует
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	отсутствует	≤ 25
ВК+	ПЦР	≤ 25	отсутствует

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 6. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) по каналу JOE/Yellow и/или для отрицательного контроля ПЦР (К-) на любом из каналов определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации